

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CONCEPTION D'UNE CHAMBRE DE CULTURE ET DE SOLLICITATION
PERMETTANT L'IMAGERIE PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE DU
DISQUE INTERVERTÉBRAL ISOLÉ

YANN-GUIREC MANAC'H

DÉPARTEMENT DE GÉNIE MÉCANIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE MÉCANIQUE)

SEPTEMBRE 2011

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

CONCEPTION D'UNE CHAMBRE DE CULTURE ET DE SOLlicitATION PERMETTANT
L'IMAGERIE PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE DU DISQUE INTERVERTÉBRAL ISOLÉ

présenté par : MANAC'H Yann-Guirec

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. YAHIA L'Hocine, Ph.D., président

Mme. PÉRIÉ-CURNIER Delphine, D.Sc., Ph.D., membre et directeur de recherche

M. MAC-THIONG Jean-Marc, MD, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Delphine Perié-Curnier pour sa direction, sa disponibilité constante, tous les conseils qu'elle m'a donnés et son soutien efficace dans la bonne humeur. Je remercie aussi Guillaume Guilbert pour son aide précieuse, le temps consacré sans limite à m'expliquer et réaliser les images IRM, et le temps passé à corriger mes articles.

Je remercie aussi mes amis et ma famille qui m'ont toujours soutenu dans ce projet. Particulièrement les amis de Montréal, toujours prêt à faire une petite pause autour d'un barbecue, ainsi que Lis pour les idées qu'elle a pu me donner dans ce projet.

RÉSUMÉ

Le disque intervertébral cristallise de nombreuses pathologies dans le monde occidental. Il est une des sources principales de douleurs chroniques. Établir un diagnostic précoce, non invasif, est une nécessité. La dégénérescence du disque s'accompagne d'un changement, pouvant être radical, de ses propriétés mécaniques. Ce changement, s'il est possible d'établir des cartes d'évolutions du disque, pourrait être détecté par l'imagerie par résonance magnétique quantitative (IRMq). Pour ce faire, il est important d'aborder deux problèmes principaux, le premier, non étudié ici, est l'amélioration du séquençage IRMq pour obtenir des séquences plus courtes, le second est la création d'atlas de dégénérescence.

Notre étude, basée sur la possibilité de culture du disque intervertébral, consiste en la création d'une chambre de culture accompagnée d'un système de sollicitation mécanique du disque. Ces deux parties vont permettre, dans un second temps, de solliciter le disque jusqu'à dégénérescence tout en l'imageant, permettant ainsi de créer un atlas de son évolution. Pour réaliser cela, il est important de pouvoir cultiver le disque pendant deux à seize semaines. Les principaux systèmes sont très complexes, trop pour une utilisation dans un système IRM.

Cette étude a été précédée de deux études complémentaires. *In-vivo* le disque est soumis à un chargement complexe, toujours en compression. *In-vitro*, le disque est le plus souvent soumis à une compression très légère pour éviter son gonflement. Ces deux caractéristiques ne sont pas comparables, ni compatibles. Une première étude sur le signal IRMq des disques comprimés a donc été réalisée. Une seconde étude, sur le signal IRMq des disques digérés par une enzyme a aussi été réalisée. Ces deux études ont consisté en l'acquisition des temps de relaxation (T1, T2), du transfert d'aimantation (MTR) et de la diffusion (FA et ADC) sur des disques intervertébraux isolés, soit soumis à de la compression, soit à de l'hydratation, soit à de la digestion par la trypsine. Les mesures ont ensuite été traitées de manière semi-automatisée pour limiter l'impact de la reproductibilité humaine. Cette recherche fondamentale a permis de mettre en lumière l'insensibilité de l'IRMq à la compression du disque, ainsi que le non changement des temps de relaxation lors de la digestion du tissu contrairement à la seule hydratation.

Un concept de chambre de culture et de sollicitation mécanique a ensuite été proposé. Cette conception a été réalisée pour permettre la culture du disque pendant un temps allant jusqu'à 14 jours, pour permettre sa sollicitation mécanique complexe. Cette sollicitation sera réalisée par

l'intermédiaire d'un bras robotique, permettant tout type de chargement, et la possibilité d'imiter un chargement physiologique sur le disque. Cette chambre permet, de plus, de suivre par IRM la dégénérescence du tissu soumis aux cycles mécaniques.

ABSTRACT

The intervertebral discs are the focal point of numerous pathologies in the western world. It is one of the main sources of chronic pain. Being able to have a practical diagnostic tool, non invasive, is now a necessity. The degenerescence of the tissue induce a change in the mechanical properties. Theses changes can be detected using quantitative magnetic resonance imaging and mapping of the degenerescence path into the tissue. To address this problem, it is crucial to look into two primary problems; first, non studied here, is the qMRI sequences, in order to have less time consuming sequences, the second is the possibility to create the cartographies of degenerescence.

Our study, based on the possibility of culture of the IVD, is the creation of a culture chamber alongside with a mechanical mean to degenerate the cultured tissue. In order to asses all the degeneration process, it is important to be able to cultivate the disc for up to ten weeks. All the current means to cultivate a disc are way too complex to be able to be adapted to MRI imaging systems.

This current study was preceded by two others. In-vivo the disc is undergoing a complex mechanical loading, always in compression. In-vitro, the discs is slightly compressed to avoid bulging. This two characteristics are neither compatibles nor comparable. A first study on the qMRI signal of compressed discs was done to assess the changes. A second qMRI study was done on the enzymatically (trypsin) digested IVD. These two studies assessed the relaxation times (T1, T2), magnetization transfer ration (MTR) and diffusion imaging (FA, ADC) on isolated IVDs. All data were semi-automatically processed to reduce the human intervention on the process to bare minimum. This fundamental research was able to show the non sensibility of qMRI to the compressed state of the IVD from 0% to 40% on isolated IVD. Also the trypsin effect on the IVD was discovered to be negligible on T1 & T2 but not on diffusion imaging.

A primary conception of a solicitation & culture chamber was done in order to cultivate tissue up to, at least, 14 days with complex mechanical loading applied on the IVD. This loading will be applied using a robotic arm with the possibility to replicate a physiological loading on the disc. This chamber permits as well the MRI imaging of the tissue when subjected to mechanical loadings.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIV
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
1.1 Le disque intervertébral.....	3
1.1.1 Structure du disque.....	3
1.1.2 Dégénérescence du disque.....	5
1.2 Imagerie par résonance magnétique quantitative (IRMq).....	7
1.2.1 Principe de l'IRM.....	7
1.2.2 Principe d'imagerie	10
1.2.3 Séquences	12
1.2.4 Temps de relaxation T1 et T2.....	13
1.2.5 Diffusion.....	15
1.2.6 Transfert d'aimantation	16
1.2.7 Utilisation des paramètres IRM dans la caractérisation du disque intervertébral	16
1.3 Sollicitation du disque	17
1.4 Culture du disque	18
CHAPITRE 2 OBJECTIFS-HYPOTHÈSES	20

CHAPITRE 3	ARTICLE 1: SENSITIVITY OF QUANTITATIVE MRI TO THE COMPRESSIVE STATE OF THE ISOLATED INTERVERTEBRAL DISCS	22
3.1	Présentation de l'article	22
3.2	Abstract	22
3.3	Introduction	23
3.4	Method	24
3.4.1	Compressive apparatus.....	24
3.4.2	Sample preparation.....	24
3.4.3	Image acquisition	26
3.4.4	Disc segmentation	27
3.4.5	Data processing	27
3.4.6	Statistical analysis	27
3.5	Results	28
3.6	Discussion	28
3.7	Conclusion.....	29
3.8	Acknowledgements	30
CHAPITRE 4	ARTICLE 2: SENSITIVITY OF QUANTITATIVE MRI TO THE TRYPSIN DIGESTION OF ISOLATED INTERVERTEBRAL DISCS	43
4.1	Présentation de l'article	43
4.2	Abstract	43
4.3	Introduction	44
4.4	Methods	45
4.4.1	Sample preparation.....	45
4.4.2	MR Imaging	45
4.4.3	Data analysis.....	46

4.4.4	Statistical analyses.....	47
4.5	Results	47
4.6	Discussion	48
4.7	Conclusion.....	49
CHAPITRE 5	COMPLÉMENTS SUR LA SEGMENTATION DES DISQUES.....	59
5.1	Choix du type de segmentation	59
5.2	Présentation de l'algorithme de segmentation.....	59
5.2.1	Filtrage des artéfacts.....	59
5.2.2	Détection des contours	60
5.2.3	Fonction utilisée	61
CHAPITRE 6	CONCEPTION D'UN APPAREIL DE SOLLICITATION MÉCANIQUE DU DISQUE INTERVERTÉBRAL	63
6.1	Cahier des charges.....	63
6.1.1	Culture du disque	63
6.1.2	Sollicitation mécanique du disque.....	64
6.1.3	Permettre l'imagerie IRM	64
6.2	Solutions choisies.....	66
6.2.1	Culture du disque	66
6.2.2	Sollicitation	68
6.3	Validation et paramétrages.....	73
6.4	Modélisation.....	74
6.4.1	Flasque	74
6.4.2	Mur	75
6.4.3	Socle de sollicitation	75
6.4.4	Préhenseur robotique.....	75

6.4.5 Socle de repos/imagerie.....	75
CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE.....	77
CONCLUSION	81
BIBLIOGRAPHIE	82
ANNEXE	91

LISTE DES TABLEAUX

Table 1-1 : Maximum physiologique de chargement du disque intervertébral (adapté de (Costi, et al., 2007))	18
Table 6-1 : Table d'analyse de conception	65

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Situation du disque intervertébral dans le rachis (adapté de Gray's Anatomy).....	3
Figure 1-2 : Situation du disque intervertébral (adapté de Atlanta Spine Institute).....	4
Figure 1-3 : Organisation des fibres de collagène dans l'IVD (adapté de (Jongeneelen, 2006))	4
Figure 1-4 : Organisation des fibres de collagène sur l'annulus fibrosus (adapté de http://med.penn.edu).....	5
Figure 1-5 : Gradation morphologique et IRM du disque dégénéré (adapté de (Thompson et al., 1990))	6
Figure 1-6 : Système d'imagerie Philips Achieva X-Series 3T (Philips)	9
Figure 1-7 : Antenne de tête Philips Sense 9 canaux (Philips)	9
Figure 1-8 : Illustration du principe de precession du spin, et de l'alignement sur un champ B0 (Wikimedia).....	9
Figure 1-9 : Orange et œuf contrastés en T2 (images personnelles).....	10
Figure 1-10 : Orange et œuf contrastés en T1 (images personnelles).....	10
Figure 1-11 : Illustration d'une séquence spin-echo (IMAIOS).....	12
Figure 1-12 : Illustration d'une séquence gradient-echo (IMAIOS)	13
Figure 1-13 : Calcul du paramètre T1 par rapport à l'intensité interpolée (Wikimedia).....	13
Figure 1-14 : Illustration du calcul du paramètre T2 (Wikimedia).....	14
Figure 1-15 : Illustration de T2* et de T2, et du calcul de T2 grâce à des pulses à 180 degrés (Wikimedia).....	14
Figure 1-16 : Imagerie du tenseur de diffusion suivant plusieurs directions non-colinéaires (IMAIOS).....	15
Figure 1-17 : Principe d'imagerie du MTR (adapté de (Wang, Witschey, Elliott, Borthakur, & Reddy, 2010)).....	16
Figure 1-18 : Chambre de culture proposé par Gantenbhein, Grünhagen & al. (adapté de (Gantenbein, et al., 2006)).....	19

Figure 5-1 : Sortie de <i>Slice2</i>	61
Figure 5-2 : Disque segmenté résultant (ici, un disque complet pour la diffusion)	62
Figure 6-1 : Exemple de technique traditionnelle de culture de disque intervertébral (adapté de (Lee, Iatridis, Poveda, & Alini, 2006)).....	66
Figure 6-2 : Disques disséqués, BEP disque avec plaques cartilagineuses et os vertébral, CEP disque avec uniquement les plaques cartilagineuses, NEP disque entièrement disséqué (adapté de (Jim, et al., 2011)).....	67
Figure 6-3 : Différence entre la culture du disque entièrement isolé et celui gardant les corps vertébraux ainsi que les plaques cartilagineuses (adapté de (Jim, et al., 2011)).....	68
Figure 6-4 : Schéma de la mise en position et du maintien en position du disque dans la chambre de culture	70
Figure 6-5 : Modèle de l'antenne de tête utilisé pour la conception.....	71
Figure 6-6 : Lynxmotion bras robotique (LynxMotion)	72
Figure 6-7 : Placement du disque dans la chambre de culture	73
Figure 6-8 : Vue de la chambre de culture, avec et sans le mur externe.....	74
Figure 6-9 : Vue supérieure du flasque d'attache du disque.....	74
Figure 6-10 : Modèle CATIA de la chambre de culture dans le socle de sollicitation	76

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRMq	Imagerie par Résonance Magnétique quantitative
MTR	Magnetization Transfer Ration
ADC	Apparent Diffusion Coefficient
FA	Fraction d'Anisotropie
PNG	Portable Network Graphic
MIP	Mise en position
MAP	Maintien en position

INTRODUCTION

Les maladies engendrant des douleurs dorsales sont parmi les plus grandes causes d'arrêts de travail et de dépenses d'assurance maladie dans le monde occidental. Les pathologies du disque intervertébral, notamment sa dégénérescence, forment une partie prépondérante de ces douleurs. La modification de position lors du travail et l'ascendance toujours croissante du fordisme, décomposition à outrance en tâches simples répétées *ad libitum* par l'individu, impactent fortement le rachis, et donc, les disques intervertébraux. Connaître l'état mécanique des disques intervertébraux, sans avoir recours à une chirurgie, est important pour la pose de certains diagnostics. L'IRM se présente comme un candidat idéal, surtout dans la conjoncture actuelle où les services de santé commencent à s'inquiéter de l'irradiation des scanners à rayons X.

Le disque intervertébral change de comportement pendant sa dégénérescence, et l'étude in-vitro d'un disque sain, sollicité de manière à devenir pathologique devient de plus en plus pertinente. En effet, il est dorénavant possible d'imager un processus de dégénérescence pendant qu'il est en train d'apparaître. De nombreux outils existent déjà pour la caractérisation de la dégénérescence des disques, tels les grades de Thompson (Thompson et al., 1990) et Pfirrmann (Griffith et al., 2007; Pfirrmann, Metzdorf, Zanetti, Hodler, & Boos, 2001), souvent associés à une inspection visuelle.

L'hypothèse principale est la possibilité de cultiver un disque et en même temps lui appliquer un chargement mécanique complexe à l'aide d'un dispositif externe. La contrainte de cette hypothèse est la demande de suivi par imagerie par résonance magnétique du disque pendant sa dégénération. L'objectif primaire est donc la conception de cette chambre de culture, de sollicitation et d'imagerie. Deux objectifs secondaires viennent encadrer ce dernier, la caractérisation de la compression du disque par IRMq et la caractérisation de la digestion enzymatique du disque par IRMq.

Le premier chapitre de ce mémoire consiste en un rapide état de l'art en matière de disque intervertébral, de sa sollicitation, de sa dégénérescence et de sa culture et une introduction à l'imagerie par résonance magnétique utilisée. Le second chapitre présente les objectifs et hypothèses de travail. Le troisième est le premier article soumis pour publication, sur la

compression du disque intervertébral isolé, le quatrième quant à lui est l'article portant sur la digestion enzymatique du disque intervertébral isolé. Le cinquième chapitre est un rapide point sur la segmentation automatique utilisée. Ensuite le sixième chapitre concerne la conception du montage de sollicitation, suivi par le septième chapitre, la discussion générale. Enfin, le huitième, et dernier chapitre, conclut le mémoire.

CHAPITRE 1 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Le disque intervertébral

Le disque intervertébral se situe au cœur de la colonne vertébrale ou rachis. Situé entre deux vertèbres, il a trois fonctions principales : assurer la liaison entre ses deux vertèbres adjacentes, procurer de la flexibilité au rachis et absorber les chocs.

1.1.1 Structure du disque

Le disque intervertébral est une structure complexe (Hsieh & Twomey, 2010), autant du point de vue des nombreux couplages existant en son sein que de sa structure mécanique. En plus des charges mécaniques, il subit le vieillissement du tissu (Buckwalter, 1995; Nerlich, Schleicher, & Boos, 1997), la génétique (D. Chan, Song, Sham, & Cheung, 2006) et le transport de nutriments et de produits biologiques (Jackson, Yuan, Huang, Travascio, & Yong Gu, 2008).

Le disque intervertébral donne six degrés de liberté à ses vertèbres support (Figure 1-1). C'est un tissu flexible, non vascularisé, permettant l'amortissement et la distribution du chargement le long de la colonne (Figure 1-2). Il est composé de deux parties, le nucléus pulposus et l'annulus fibrosus.

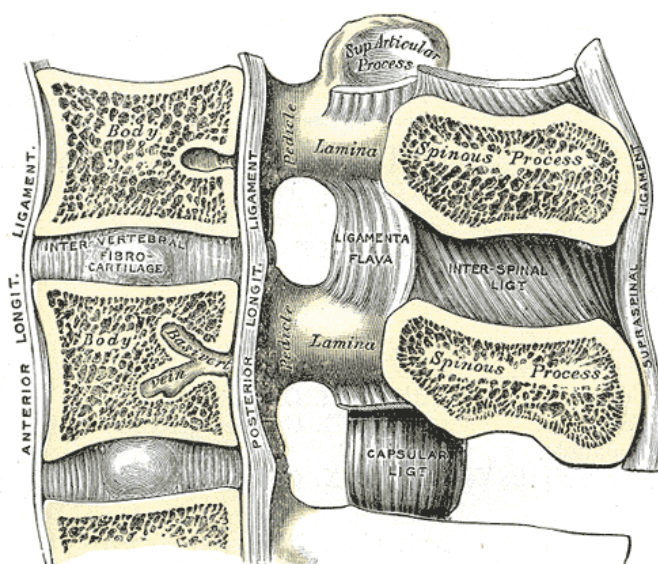


Figure 1-1 : Situation du disque intervertébral dans le rachis (adapté de Gray's Anatomy)

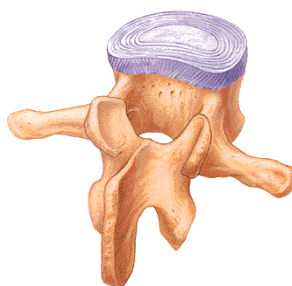


Figure 1-2 : Situation du disque intervertébral (adapté de Atlanta Spine Institute)

1.1.1.1 Nucléus pulposus

Le nucléus pulposus est situé dans la partie centrale du disque, légèrement décalé en postérieur. Il peut représenter entre 30 et 60% de la surface du disque, et environ 20% de son poids sec. L'eau représente environ 70 à 80% de son poids. Le nucléus pulposus est composé d'un matériau gélatineux, essentiellement un mélange d'eau et de protéoglycanes, dans lequel est entremêlé, sans direction particulière, un réseau de fibres de collagène (Figure 1-3), principalement de type II (Nerurkar, Elliott, & Mauck, 2010). Il est possible de retrouver du collagène de type VI, IX et XI.

Le résultat de cette composition particulière permet au disque de présenter une pression osmotique, générée par la charge négative des protéoglycanes attirant les ions positifs, non nulle, ce qui lui permet d'encaisser les efforts et charges mécaniques.

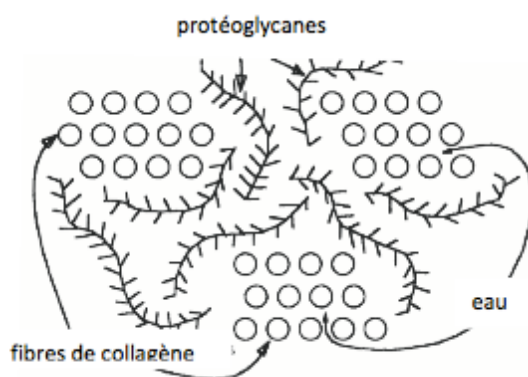


Figure 1-3 : Organisation des fibres de collagène dans l'IVD (adapté de (Jongeneelen, 2006))

1.1.1.2 Annulus fibrosus

L'annulus fibrosus est quant à lui un anneau fibreux entourant le nucléus pulposus. Il peut être décomposé en deux parties, l'annulus externe, et l'annulus interne, en contact avec le nucléus. Sa structure, composée d'un entrelacs de lamelles de collagène très fortement alignées est très anisotrope. L'angle de ces lamelles, par rapport au plan transversal du rachis, est proche de 30 degrés (Cassidy, Hiltner, & Baer, 1989). Au niveau intra-lamellaire, cette structure est plus complexe; les lamelles sont discontinues et traversées par des éléments fibreux courant radialement vers l'extérieur (Nerurkar, et al., 2010). Le collagène présent dans l'annulus est semblable à celui présent dans le cartilage ou les tendons. Il est du type I, II, III, V, VI, IX et XI. À mesure que l'on s'éloigne du centre, la propension en collagène de type I augmente. Cette partie plus concentrée en collagène est plus ordonnée, ce qui donne une plus grande résistance à la partie externe du disque (Figure 1-4). L'annulus externe est directement fixé au corps vertébral tandis que l'annulus interne est en contact avec les plateaux cartilagineux.

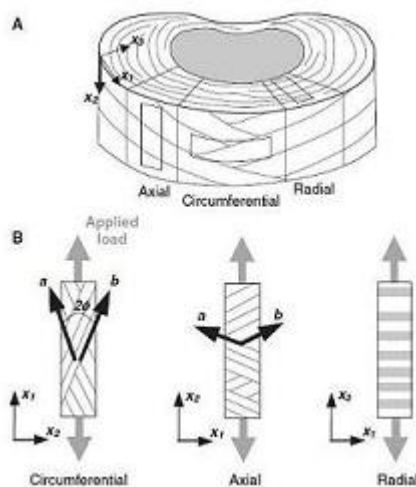


Figure 1-4 : Organisation des fibres de collagène sur l'annulus fibrosus (adapté de <http://med.penn.edu>)

1.1.2 Dégénérescence du disque

De nombreuses causes peuvent mener à la dégénérescence du disque intervertébral; les problèmes de nutrition du nucléus, les mutations de protéines, une accumulation de produits dégradés, les fractures de la matrice fibreuse...

Le disque étant non vascularisé, il dépend entièrement de la diffusion à partir des artères en périphérie de l'annulus et du corps vertébral. Avec l'âge, ces artères se raréfient et les plateaux cartilagineux perdent leur porosité, entraînant ainsi une dégénérescence (Buckwalter, 1995) (Figure 1-5). La modification du disque modifie profondément ses propriétés mécaniques, l'intégrité du disque n'est dès lors plus garantie (Urban & Roberts, 2003). L'équilibre de la matrice est mis en péril, le disque perd des protéoglycanes, ce qui diminue sa capacité à utiliser son contenu en eau pour amortir les charges (Urban & McMullin, 1988). Le disque s'écrase dès lors plus que normalement, et s'abîme plus rapidement.

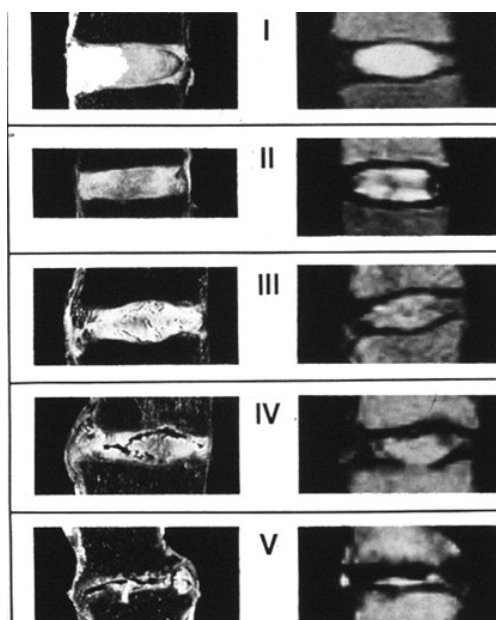


Figure 1-5 : Gradation morphologique et IRM du disque dégénéré (adapté de (Thompson, et al., 1990))

Mécaniquement, la dégénérescence peut apparaître avec la scoliose, déformation tridimensionnelle de la colonne vertébrale ayant des incidences sur le plan frontal, le profil sagittal, les rotations dans les différents plans et la forme générale de la cage thoracique (Pope, Stokes, & Moreland, 1984). Ce processus a tendance à entraîner des déformations structurales dans l'intégrité du rachis, donc le disque intervertébral (Aubin et al., 1998).

Les déformations scoliotiques apparaissent essentiellement pendant la croissance squelettique. Cette dernière étant retardée par une compression accrue et accélérée par une compression diminuée (Roaf, 1960), la scoliose est un processus qui s'auto-amplifie. Cette auto-amplification

existe aussi dans les disques intervertébraux (Stokes, Spence, Aronsson, & Kilmer, 1996) qui dégénèrent et/ou s'extrudent et/ou modifient leur positionnement dans le rachis.

Un autre processus de dégénérescence mécanique est le spondylohistésis. Cette pathologie est définie par un glissement postéro-antérieur d'une vertèbre par rapport à sa vertèbre sous-jacente. Elle induit un fort chargement en cisaillement sur le disque (Dai, 2000). Cette contrainte est calculable en utilisant les propriétés moyennes du disque (Nerurkar, et al., 2010), et le glissement des vertèbres.

Cependant, ces classements ne permettent pas d'être certains de l'état d'un disque uniquement par imagerie (Igbinedion & Akhigbe, 2011). En effet, il peut y avoir des cas où les disques semblent sains et ces derniers sont source de douleur et le contraire est aussi possible (Chou et al., 2011); de plus, la plupart des patients âgés présentent des disques dégénérés en imagerie clinique.

Les différentes techniques d'imageries et de classement peuvent être non corrélées entre elles, et ne pas l'être avec la douleur (Alamin, Kim, & Agarwal, 2011). Ces cas illustrent la difficulté de caractérisation du disque intervertébral en imagerie clinique, effectuée en contrasté et non quantitatif la plupart du temps.

In vitro, il existe deux possibilités pour induire une dégénérescence dans le disque, soit mécaniquement, soit chimiquement par digestion.

1.2 Imagerie par résonance magnétique quantitative (IRMq)

L'IRM quantitative permet d'extraire les paramètres IRM, et non pas simplement une image contrastée. Ainsi, une séquence spécifique est répétée plusieurs fois en faisant varier un seul paramètre principal de la séquence à chaque fois, dans le but de caractériser la modification apportée par la variation de ce paramètre, et donc, ce paramètre.

1.2.1 Principe de l'IRM

L'imagerie par résonance magnétique repose sur le principe de variation de moment magnétique des atomes d'hydrogène. Ces derniers, au repos, dans un environnement neutre d'excitation, ont un vecteur d'orientation global neutre, i.e. le vecteur unitaire du proton (pseudo-ion H^+) est orienté aléatoirement, la somme est donc statistiquement nulle. Lors de l'application

d'un champ magnétique de forte puissance, le vecteur d'orientation du pseudo-ion H^+ a tendance à devenir globalement non nul (Figure 1-8), ce qui conduit à une aimantation statistiquement non nulle, dans le sens du champ appliqué. L'appareillage est constitué d'un aimant (Figure 1-6) et d'une antenne (Figure 1-7) permettant l'excitation des pseudo-ions et l'acquisition du signal. Une acquisition IRM est simplement l'inférence du temps de retour à un équilibre après un déséquilibre forcé.



Figure 1-6 : Système d'imagerie Philips Achieva X-Series 3T (Philips)



Figure 1-7 : Antenne de tête Philips Sense 9 canaux (Philips)

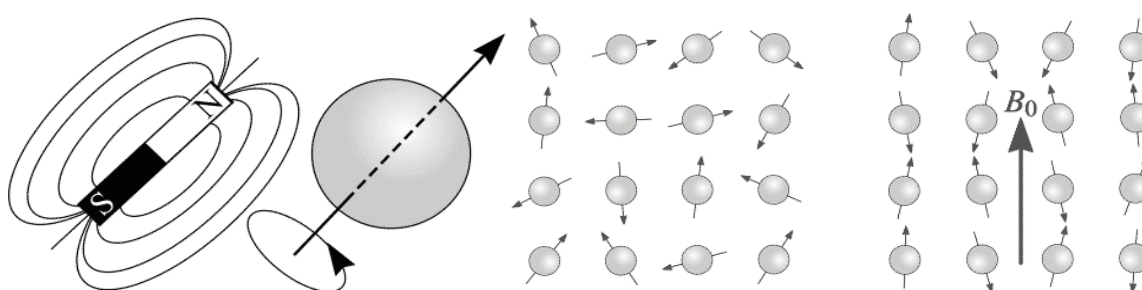


Figure 1-8 : Illustration du principe de precession du spin, et de l'alignement sur un champ B_0
(Wikimedia)

1.2.2 Principe d'imagerie

1.2.2.1 Contraste et quantitatif

L'image peut-être soit contrastée, soit acquise en quantitatif. Lorsque l'image est acquise en contraste ou pondération, l'acquisition se fait une seule fois et résulte en une image donnant précedence soit au T2 (Figure 1-9), soit au T1 (Figure 1-10), (cf. 1.2.4) ou autre paramètre IRM. Lors de l'acquisition en quantitatif, l'acquisition doit faire l'objet d'un traitement pour obtenir la valeur, en ms, du temps de relaxation du tissu (pour T1, T2, T2*) ou la valeur du paramètre dans le cas de la diffusion ou du transfert d'aimantation.

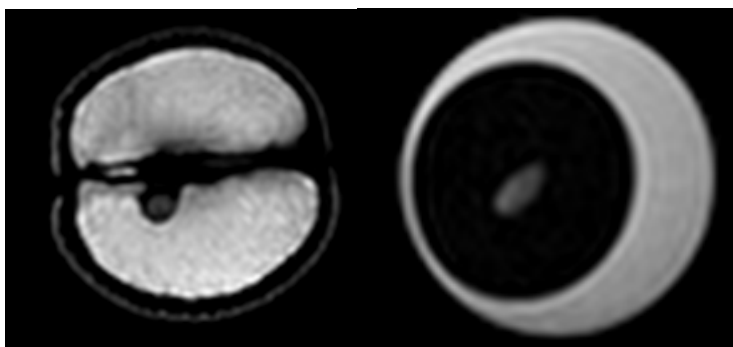


Figure 1-9 : Orange et œuf contrastés en T2 (images personnelles)

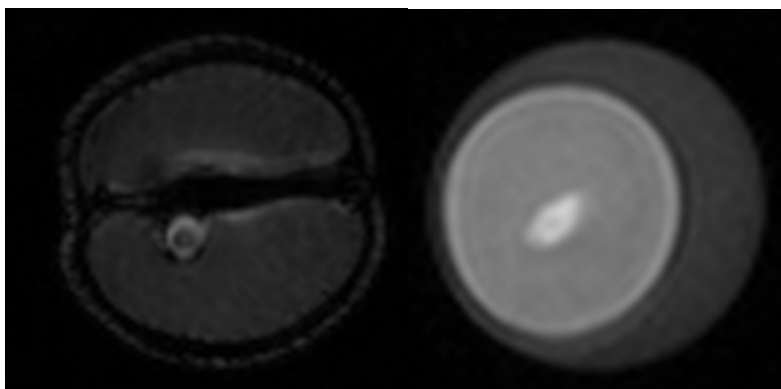


Figure 1-10 : Orange et œuf contrastés en T1 (images personnelles)

1.2.2.2 Codage spatial

Le codage spatial dans l'IRM se fait par l'application successive de gradients de champ magnétique. En premier, la sélection de coupe (gradient de sélection de coupe GSC) permettant de sélectionner le volume devant être exploré. Ce premier gradient est suivi d'un gradient de codage par phase (GCP) et d'un gradient de codage par fréquence (GCF). Tous ces gradients ont

des caractéristiques identiques, mais sont appliqués à des moments différents, et suivant des directions différentes. Cette équivalence entre le GSC, le GCP et le GCF permet de réaliser les coupes dans tous les plans de l'espace.

1.2.2.2.1 Gradient de sélection de coupe

Ce gradient est un gradient de champ magnétique. Appliqué dans une direction perpendiculaire au plan d'intérêt, il s'additionne à B_0 , donnant aux protons un gradient de précession proportionnel à GSC. Simultanément, il est appliqué une onde RF de fréquence, celle des protons du plan d'intérêt; seuls ces derniers subissent une bascule d'aimantation, permettant la future obtention d'un signal.

1.2.2.2.2 Gradient de codage de phase

Ce gradient s'applique dans une direction perpendiculaire à la précédente. Il permet de modifier la fréquence de précession des spins, induisant un décalage de phase. Lors de la captation du signal, chaque ligne de proton aura un décalage de phase différent, ceci permet de récupérer les lignes, avec leur position.

1.2.2.2.3 Codage de fréquence

Ce gradient s'applique pendant l'acquisition du signal, suivant la dernière direction. Ce gradient va modifier la fréquence de précession des protons, permettant le codage de la troisième dimension. Ce gradient étant appliqué pendant le recueil du signal, l'information en fréquence est directement incluse.

1.2.2.3 Temps TR et TE et contraste

Le temps d'écho TE est le temps entre l'impulsion à 90 degrés et l'acquisition du signal. Dans la séquence spin-echo, l'impulsion à 180 degrés est émise à TE/2. Le temps de répétition TR est le temps entre deux impulsions à 90 degrés.

La modulation des valeurs de TE et TR et du rapport TR/TE permet de modifier le contraste, soit en T1, soit en T2 (T2*). L'ajout d'agents de contraste (tels le gadolinium) permet de modifier les temps de relaxation des tissus, donc le contraste.

1.2.3 Séquences

Il existe plusieurs types de séquences, cependant, il est possible de les classer sous forme de familles :

- les séquences de type spin-écho (Figure 1-11);
- les séquences de type gradient-écho (Figure 1-12).

Les séquences spin-écho (écho de spin) sont caractérisées par l'application d'une onde de perturbation à 90 degrés, puis une onde de re-phasage à 180 degrés. Il existe des séquences spin-écho, fast spin-écho, ultra-fast spin-écho (Single Shot et Haste). Plus les séquences sont rapides, plus elles sont applicables pour la diffusion.

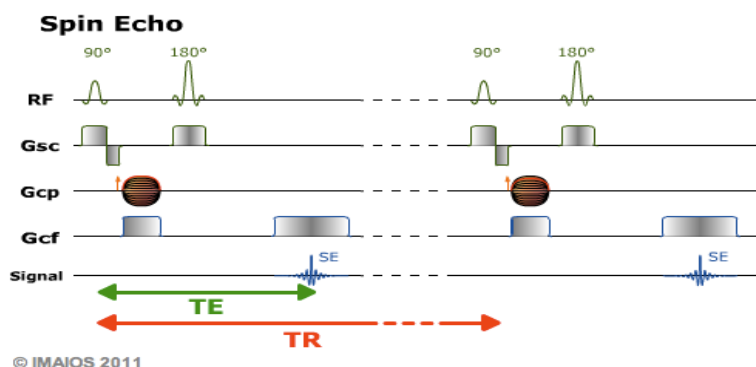


Figure 1-11 : Illustration d'une séquence spin-écho (IMAIOS)

Les séquences de gradient ont majoritairement été développées pour l'augmentation des contrastes et de la vitesse. Une séquence écho-gradient se différencie de l'écho de spin par un angle de bascule, en général, inférieur à 90 degrés, et l'absence de re-phasage à 180 degrés. Cette bascule à moins de 90 degrés permet de diminuer la quantité d'aimantation basculée, le retour à l'équilibre étant, de fait, plus rapide. Ce type de séquence permet de diminuer le TR (temps de répétition). L'imagerie se fait donc à TR et TE faible, ce qui permet, par exemple, de réaliser des images 3D en peu de temps. Plus l'angle de bascule augmente, plus la séquence se rapproche de la séquence spin-écho classique.

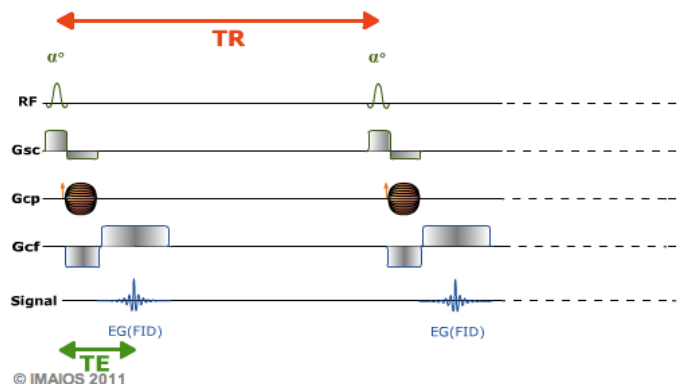


Figure 1-12 : Illustration d'une séquence gradient-echo (IMAIOS)

1.2.4 Temps de relaxation T1 et T2

Le temps de relaxation longitudinal T1 est la mesure de 63% du temps de retour après application d'une onde RF perturbatrice à 90 degrés. Cette onde particulière oblige la bascule du vecteur d'orientation vers son antiparallèle. La mesure de la composante longitudinale au moment du retour à l'équilibre permet de tracer la forme d'une courbe de type exponentielle. Cette dernière permet ensuite d'extraire (à 63%¹ de la valeur finale) la valeur de T1 (Figure 1-13). Cette valeur est sensible à la mobilité des molécules et T1 sera plus court pour de grosses molécules.

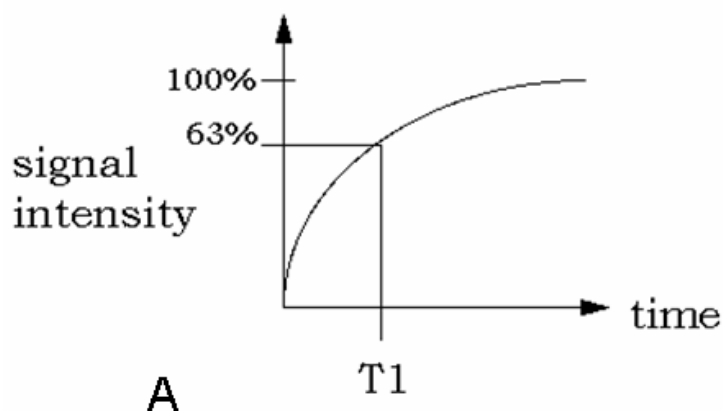


Figure 1-13 : Calcul du paramètre T1 par rapport à l'intensité interpolée (Wikimedia)

De même, il est possible d'extraire le temps de relaxation transverse T2 en utilisant la forme de retour de la composante transversale du vecteur d'orientation (nommé Free Induction Decay,

¹ En fait, $1-e^{-1}$

FID) (Figure 1-14). Cette enveloppe est encore de la forme d'une exponentielle, mais cette fois-ci décroissante. En raison des hétérogénéités de champs et moléculaires, le calcul direct de cette constante (à 37%² de la valeur initiale) n'est pas directement le T2, mais le T2* (Figure 1-15). Pour obtenir la constante T2, il faut rétablir la cohérence de phase, donc appliquer une seconde impulsion, cette fois-ci à 180 degrés.

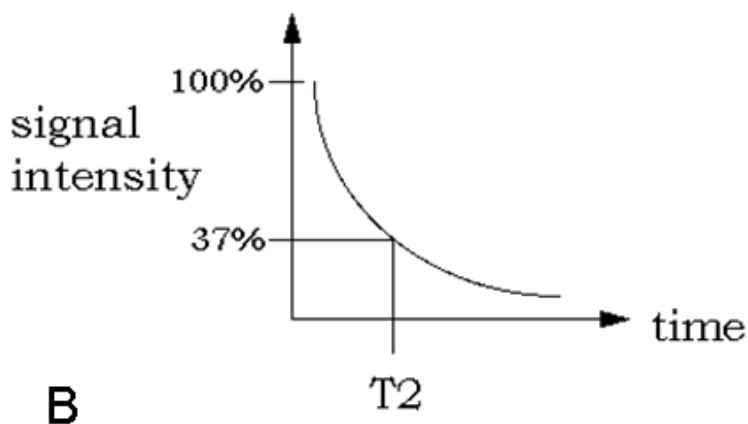


Figure 1-14 : Illustration du calcul du paramètre T2 (Wikimedia)

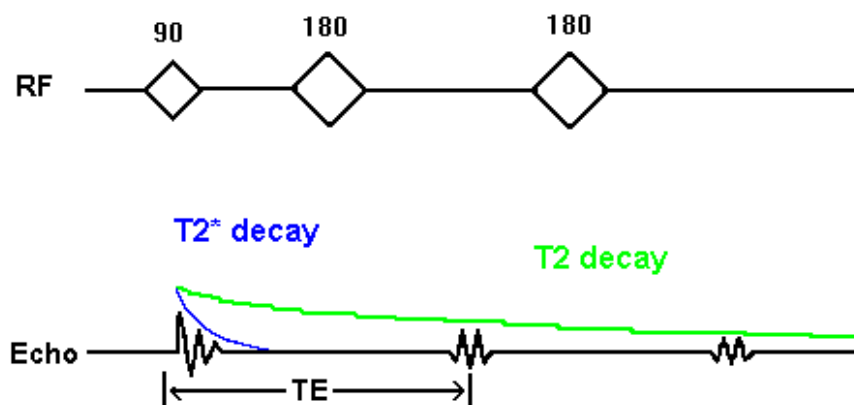


Figure 1-15 : Illustration de T2* et de T2, et du calcul de T2 grâce à des pulses à 180 degrés (Wikimedia)

² En fait, e^{-1}

1.2.5 Diffusion

Les séquences de diffusion sont utilisées pour quantifier les (micro-)mouvements des molécules d'eau dans les voxels (unité minimale de résolution d'imagerie). Ce déplacement permet d'obtenir de l'information structurale sur le milieu environnant.

La séquence de type DTI (Diffusion Tensor Images) est utilisée. Il faut acquérir au minimum 6 gradients non colinéaires (dans l'idéal, plus de 15). Ces gradients sont ensuite traités pour obtenir l'ensemble des informations de diffusion dans n'importe quelle direction de l'espace. L'imagerie par diffusion est extrêmement sensible aux déplacements (mouvement, distorsion, dilatation), résultant d'une perturbation des gradients.

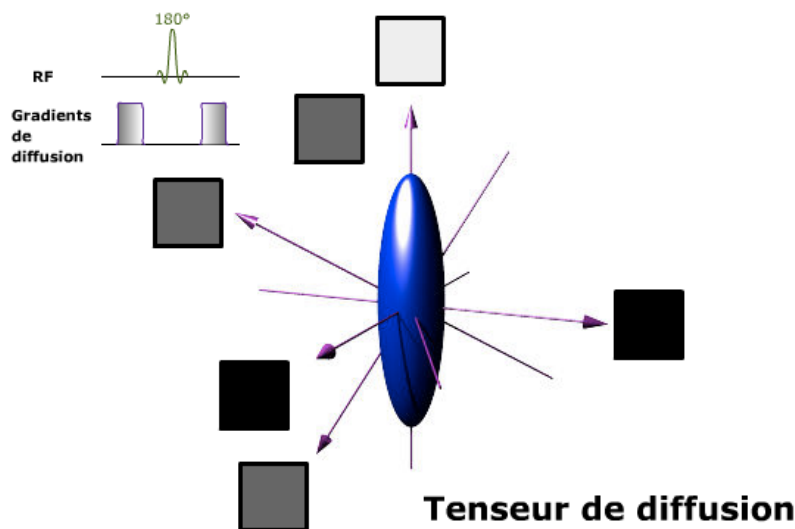


Figure 1-16 : Imagerie du tenseur de diffusion suivant plusieurs directions non-colinéaires (IMAIOS)

Le coefficient apparent de diffusion (ADC) permet d'obtenir l'image de la mobilité des molécules d'eau. Il se calcule en appliquant des gradients, la magnitude résultante permet de calculer une image pondérée en diffusion globale, i.e. *image trace*. Le coefficient de diffusion apparent se calcule à partir de deux images présentant un facteur b différent. Ce facteur b est déterminé conjointement par l'amplitude, la durée et l'espacement temporel des gradients appliqués. Plus ces valeurs augmentent, plus b est important.

La fraction d'anisotropie est la représentation de l'isotropie de diffusion dans le tissu. Sa valeur est comprise entre 0 et 1. Une valeur de 0 indique une diffusion parfaitement isotrope (ou également restreinte) dans toutes les directions. Une valeur de 1 indique une diffusion

uniquement suivant un seul axe. Le FA est souvent utilisé dans l'imagerie de diffusion pour suivre les fibres, avoir une mesure qualitative de la densité de fibres et dans le cerveau pour le suivi de la matière blanche. Le FA est calculé à partir des valeurs principales du tenseur de diffusion.

1.2.6 Transfert d'aimantation

Ce paramètre permet de caractériser le signal de certaines macromolécules. Une image est générée par l'application d'une onde perturbatrice située à 1,5 KHz de la fréquence de précession des protons libres (contenus dans l'eau libre) (Figure 1-17), ce qui sature les protons liés. Cette saturation est transmise aux protons liés, de proche en proche. L'acquisition de cette image est précédée de l'acquisition d'une image pondérée en T2. La différence entre ces deux images permet d'obtenir uniquement le signal des protons liés, donc celui des macromolécules.

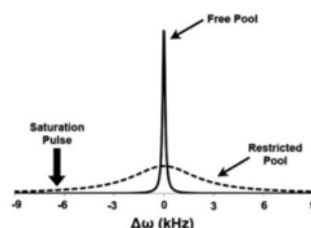


Figure 1-17 : Principe d'imagerie du MTR (adapté de (Wang, Witschey, Elliott, Borthakur, & Reddy, 2010))

1.2.7 Utilisation des paramètres IRM dans la caractérisation du disque intervertébral

La diminution de l'intensité du signal dans le disque, associée à la présence de tâches dans l'annulus fibrosus est liée à de nombreux symptômes en discographie (Horton & Daftari, 1992; Kornberg, 1989; Linson & Crowe, 1990). La résonance magnétique permet aussi de quantifier les changements de volume discal suivant la mise en charge du rachis ou du cycle d'activité journalier (LeBlanc, Evans, Schneider, Wendt, & Hedrick, 1994; Malko, Hutton, & Fajman, 1999). Des auteurs ont aussi montré la corrélation entre les mouvements de flexion-extension du rachis et la migration de la zone nucléaire (Beattie et al., 1994; Brault et al., 1997; Fennell, Jones, & Hukins, 1996).

Ces différents résultats permettent d'affirmer que l'imagerie par résonance magnétique, ici non quantitative, permet de décrire l'état physiologique du disque intervertébral. Cependant, ces techniques sont souvent limitées par une faible résolution spatiale envers le disque et un rapport signal/bruit plutôt faible (Hargreaves et al., 2003).

L'IRM quantitatif a été utilisé, avec succès, pour caractériser les variations des paramètres IRM au cours du temps (Boos, Wallin, Gbedegbegnon, Aebi, & Boesch, 1993) ou avec la dégénération des tissus (Kiviranta et al., 2007; Kurunlahti, Kerttula, Jauhiainen, Karppinen, & Tervonen, 2001) ainsi que pour observer le contenu hydrique et la composition biochimique du tissu, principalement cartilagineux et intervertébral (Antoniou et al., 1998; Bashir, Gray, Hartke, & Burstein, 1999; Chiu et al., 2001).

Suite à ces avancées, de nombreux auteurs ont cherché à corréler les propriétés biochimiques et/ou biomécaniques du disque intervertébral avec les propriétés IRM quantitatives (Campana et al., 2011; Marinelli, Haughton, Munoz, & Anderson, 2009; Nissi et al., 2007; Wang, et al., 2010).

1.3 Sollicitation du disque

Les origines mécaniques, fatigue, hyper-flexion ou torsion, sont connues comme étant des causes potentielles aux ruptures mécaniques du disque intervertébral (Adams & Hutton, 1982; Farfan, Cossette, Robertson, Wells, & Kraus, 1970; Yu et al., 2003). Les conditions physiologiques de chargement en compression axiale, telles que soulignées par Chan & al. (S. C. Chan, Ferguson, & Gantenbein-Ritter, 2011), sont entre 0.3 et 0.8 MPa, à une fréquence comprise entre 0,2 à 1,4 Hz. Costi & al. (Costi et al., 2007) ont réalisé une étude sur les mouvements physiologiques mettant le disque en position de risque, leurs résultats sont résumés dans le tableau suivant (Table 1-1).

Mouvement	Maximum physiologique (% contrainte)
Compression	12.6
Cisaillement antérieur	11.5
Cisaillement postérieur	11.6

Cisaillement latéral	14.4
Flexion	38.3
Extension	13.5
Rotation axiale	9.4
Bending latéral	57.8

Table 1-1 : Maximum physiologique de chargement du disque intervertébral (adapté de (Costi, et al., 2007))

Il a été montré (Adams, McNally, & Dolan, 1996) que, lors de la compression, le profil de distribution de la contrainte dans le disque se modifie complètement entre un disque sain et un disque dégénéré. Certains pics peuvent apparaître, modifiant complètement le comportement du disque.

1.4 Culture du disque

La culture du disque intervertébral s'est fortement développée ces dernières années. Elle permet maintenant de garder le disque en vie avec un procédé suffisamment simple pour permettre d'étudier l'impact des chargements mécaniques à long terme sur le disque

Elle est passée d'un procédé lourd et complexe, impliquant la dissection totale du disque et une circulation constante du média de culture au travers du disque et de filtres, à une culture beaucoup plus simple ne nécessitant plus que l'approche du disque en gardant les corps vertébraux, sans avoir besoin de maintenir de circulation de média de culture dans la chambre.

La technique proposée par Gantenbhein, Grünhagen & al. (2006) (Figure 1-18) est un exemple de système complexe de culture. Le média passe à travers une série de filtre avant le disque et nécessite une circulation constante.

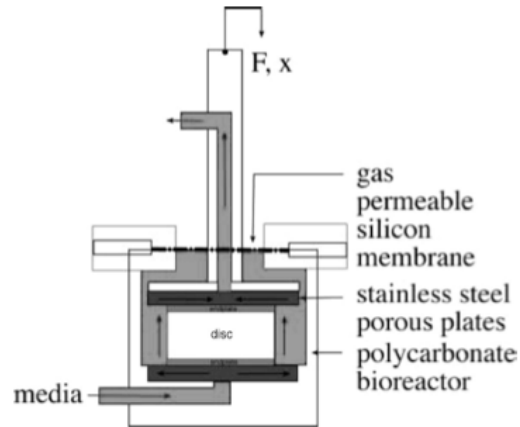


Figure 1-18 : Chambre de culture proposé par Gantenbhein, Grünhagen & al. (adapté de (Gantenbein, et al., 2006))

Aujourd'hui, la sauvegarde des plaques de croissance semble faire consensus. Cette technique permet d'avoir une meilleure viabilité du tissu (Gawri et al., 2011; Haglund, 2011; Haschtmann, Stoyanov, Ettinger, Nolte, & Ferguson, 2006; Jim, Steffen, Moir, Roughley, & Haglund, 2011; Shirazi-Adl, Taheri, & Urban, 2010), qui peut être cultivé pendant plus longtemps; des résultats ont montré jusqu'à quatre semaines.

CHAPITRE 2 OBJECTIFS-HYPOTHÈSES

L'objectif à long terme de ce projet est de développer des outils d'imagerie permettant de faire le suivi longitudinal de la dégénérescence du disque intervertébral. Cette dégénérescence possède deux composantes, mécanique et biochimique. De nombreuses études ont tenté de simuler cette dégénérescence par stimulation mécanique ou digestion enzymatique in vitro. Cependant, le disque intervertébral in vivo n'est pas soumis au même environnement mécanique ou biochimique que in vitro. L'IRM quantitative du disque est-elle sensible à ces changements ? Plus précisément, nous avons formulé deux questions :

- Le signal IRMq du disque intervertébral isolé est-il modifié lorsque le disque est comprimé?
- Le signal IRMq du disque intervertébral isolé est-il modifié lorsque ce dernier est soumis à un protocole de digestion?

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- Conception et fabrication d'un outil permettant la compression des disques intervertébraux isolés dans l'IRM, couvrant les limites physiologiques normales;
- Développement d'un outil de segmentation automatique des disques sur les images IRM et d'analyse des cartographies IRMq;
- Évaluation de la sensibilité de l'IRM quantitative à la compression du disque isolé
- Évaluation de la sensibilité de l'IRM quantitative à la digestion enzymatique du disque isolé
- Conception d'une chambre de culture et de sollicitation mécanique du disque intervertébral permettant l'étude du signal IRMq du disque intervertébral pendant une campagne de sollicitation mécanique conduisant à sa dégénérescence.

Les deux hypothèses de travail sont : 1) la non modification du signal du disque soumis à la compression, et 2) l'observation d'une modification significative lors de la dégénérescence du disque sur le signal IRMq.

La première hypothèse va permettre, suite aux acquisitions et interprétation obtenues des résultats, l'écriture d'un premier article sur la compression du disque intervertébral isolé. De plus, cette étude de compression va permettre, du fait de l'hypothèse de non modification du signal, de valider l'application de compression sur le disque en culture lors des phases de repos. La seconde hypothèse va permettre la production d'un second article sur la dégénérescence enzymatique du disque intervertébral isolé ainsi qu'une méthode fiable de production de disque présentant plusieurs stades de dégénérescence pour permettre de voir rapidement des changements en utilisant ce type de disque comme témoin de dégénérescence en chambre de culture.

CHAPITRE 3 ARTICLE 1: SENSITIVITY OF QUANTITATIVE MRI TO THE COMPRESSIVE STATE OF THE ISOLATED INTERVERTEBRAL DISCS

Y.-G. Manac'h^{1,2}, G. Gilbert³, G. Beaudoin⁴, D. Perié^{1,2}

1 - Research Center, CHU St Justine, Montréal, QC Canada

2 - Mechanical Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal, QC, Canada

3 - Philips Healthcare, Montréal, QC, Canada

4 - Physics and Biomechanical Engineering, CHUM Notre Dame, Montréal, QC, Canada

3.1 Présentation de l'article

Le disque intervertébral isolé a rarement été étudié uniquement sur sa compression. L'état de l'art n'a pas montré d'études réalisant uniquement une compression pour en voir l'effet sur l'image IRM résultante. L'hypothèse de ce travail est que l'état d'image du disque ne se modifie pas avec la compression, ce qu'aucune étude ne permet d'affirmer ou d'infirmer aujourd'hui.

Cet article, intitulé « *Sensitivity of quantitative MRI to the compressive state of the isolated intervertebral discs* » a été soumis pour publication à la revue MRI en Août 2011. La contribution du premier auteur à la préparation et à la rédaction de l'article est évaluée à 85%.

3.2 Abstract

Objective: MRI offers great potential as a sensitive and non-invasive technique for describing the alterations in mechanical properties, as shown in vitro on IVD or cartilage tissues. However, in vivo, the IVD is submitted to complex loading stimuli. Thus, the present question focuses on the influence of the mechanical loading during an MRI acquisition on the relaxation times, magnetization transfer and diffusion parameters within the IVD.

Methods: An apparatus allowing the compression of isolated intervertebral discs was design and manufactured in ABS. IVDs were dissected from fresh young bovine tail, measured for their thickness and submitted to compression just before the MRI acquisition. Six discs received 0%

(platen positioned at the initial disc thickness), 5% (platen positioned at 95% of the initial disc thickness), 10%, 20% and 40% deformation. The MRI parameters were compared between the loading states using mean and standard deviation for T1 and T2, and matrix subtraction for MT, FA and ADC.

Results: The compression of the IVD did not lead to any significant change of the MRI parameters, except for the diffusion that decreased in the direction of the compressive stress.

Discussion: This experimental in-vitro study shows that qMRI on isolated discs in vitro is not sensitive to compression neither to the partial confined relaxation that followed the compression.

3.3 Introduction

The degeneration of the intervertebral disc (IVD) can be measured using quantitative MRI that reflects the changes in tissue hydration, composition and structure. Relationships were found between biochemical contents and MRI parameters [1-4]. T1, T2 and magnetization transfer ratio (MTR) at 1.5T were found to be correlated to the water content and proteoglycan (GAG) content, but not to the collagen content or percentage of denatured type II collagen [3, 5], whereas the apparent diffusion coefficient was directly related to proteoglycans content and inversely related to collagen denaturation [6].

More recently, some authors have shown that MRI offers great potential as a sensitive and non-invasive technique for describing the alterations in mechanical properties of IVD [7-11] or cartilage [2, 12]. Correlations were found in cartilage between the longitudinal relaxation time T1gd as measured by Gadolinium-Enhanced MRI and the local stiffness as measured by mechanical indentation [13], or unconfined compression [14-17]. The spin-lock longitudinal relaxation time T1r was strongly correlated to the compressive modulus and the hydraulic permeability in cartilage [18] and to the swelling pressure in human nucleus pulposus [19]. On bovine nucleus pulposus, significant correlations were found between the hydraulic permeability and the relaxation times or the apparent diffusion coefficient (ADC) [20]. Moreover, the compressive modulus of the nucleus pulposus was found to be correlated to the longitudinal relaxation times T1 and T1r, while the hydraulic permeability of annulus fibrosus was found to be inversely correlated to T1r [8].

All these studies were performed *in vitro* on bovine or human tissues, and their objective was to apply these relationships to the quantitative MRI parameters acquired *in vivo* on patients with spine pathologies, deduce the biochemical or biomechanical properties of the degenerated disc, and then improve the diagnosis or treatment. However, *in vivo*, the IVD is submitted to complex loading stimuli [12, 21]. This *in vivo* loading is different from the loading existing in spine segments or isolated discs.

Thus, the present question focuses on the influence of the mechanical loading during an MRI acquisition on the relaxation times, magnetization transfer and diffusion parameters within the IVD. The aims of this study were 1) design and manufacture an apparatus allowing control of the deformation of the IVD within the MRI system; and 2) quantify the effect of the loading on the mapping of MR relaxation times, magnetization transfer and diffusion parameters within the IVD.

3.4 Method

3.4.1 Compressive apparatus

An apparatus was designed to compress four isolated intervertebral discs within a human MRI system. The chamber was divided into 4 compartments filled with a phosphate buffer solution (PBS) solution to receive 4 discs at the time and fits within the head coil of the MRI system. Compression was applied by 4 platens moving up and down, and its amplitude was controlled manually by screw rotation.

The apparatus was manufactured in ABS (acrylonitrile butadiene styrene) by rapid prototyping (fused plastic deposit). The fused string was 2mm thick and used in high density to minimize air trapping inside the tool.

3.4.2 Sample preparation

Bovine (6 months old) tails were obtained from a local slaughterhouse (Viandes Forget, Terrebonne, QC, Canada) within 4 hours of death. The two proximal discs were harvested from

each tail. Each disc was measured for its thickness by two operators using a caliper, wrapped in plastic and directly transported, on ice, to the MRI facilities. Twelve discs were randomly separated in two groups. The first group of discs (n=6) received 0% (platen positioned at the initial disc thickness), 5% (platen positioned at 95% of the initial disc thickness) and 10% compression, while the other one received 0%, 20% and 40% compression.

3.4.3 Image acquisition

The acquisition was performed using a 3T whole body system (Philips Achieva X Series). A single slice, 5mm thick, was taken in the coronal plane. Images for the quantification of T1 and T2 were acquired using a multiple inversion recovery turbo spin-echo (TSE) for T1 (TR/TE = 2100/6.3ms, 15 inversions times (TI) from 50ms to 1900ms) and a multi-echo turbo spin-echo for T2 (TR=2000ms, 10 TE every 15ms). T1 and T2 were extracted (Matlab r2010b, Mathworks, Natick, MA) from the signal intensity (SI) by non- linear regression to the equations (1) and (2) [22].

$$(1) \quad SI_{TI} = S_0 \left[1 - (1 - \cos(\alpha)) E_{TI} \left(1 - E_{TW} f^N \left(1 - \frac{E_{TE/2}}{2} \right) \right) \right]$$

With α the refocusing angle, $f(x) = 1 - E_{TE}x$, $E_{TI} = e^{-TI/T1}$, $E_{TW} = e^{-TW/T1}$, $E_{TE} = e^{-TE/T1}$ & $N = 8$

$$(2) \quad SI_{TE} = SI_{(TE=0)} e^{-TE/T2}$$

Where SI is the signal intensity, TW is the time in *ms* between the last refocusing pulse and the next inversion pulse, and N is the number of refocusing pulses.

The MTR was obtained using two gradient echo sequences (TR/TE = 83/3.8ms), one with the off resonance pulse applied at 1100Hz down to the free water proton resonance frequency (Ms) and the other one without it (Mo) [23]. The MTR was calculated from equation (3) [24].

$$(3) \quad MTR = \frac{M_o - M_s}{M_o}$$

The last sequence measured the ADC and the fractional anisotropy (FA) using a spin- echo EPI diffusion weighted sequence (TR/TE = 2000/40ms) with 15 non collinear diffusion and a b values of 1000 s/mm². ADC and FA were calculated using equations (4), (5) & (6) [25]

$$(4) \quad SI_{(b)} = SI_{(b=0)} e^{-bD}$$

$$(5) \quad ADC = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3}$$

$$(6) \quad F_A = \sqrt{\frac{3[(\lambda_1 - ADC)^2 + (\lambda_2 - ADC)^2 + (\lambda_3 - ADC)^2]}{2(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2)}}$$

Where b is the diffusion-encoded tensor, D the diffusion tensor and λ the eigenvalues of D .

3.4.4 Disc segmentation

The segmentation of the regions of interest (ROI) was realized using Canny edge detection.

3.4.5 Data processing

The results were extracted, for T1 and T2, using two global means (with standard deviation), one for the AF and one for the NP. The global distribution envelope profile was also plotted in order to compare the different distributions. They were plotted using the whole segmented subset, divided in 100 bins. Trend lines were calculated using linear regression on each plot.

For the FA 3D vectors, a color mapping was used on each axis: the X axis was red, the Y axis green and the Z axis blue. Two comparisons were made: the first one using the subtraction of the global matrixes, the second one using the profile plot of the color distribution within each disc, hence the projection of the diffusion vector on the three axis. The diffusion anisotropy factor and the magnetization transfer ratio were extracted using solely the subtraction of two loading steps, hence resulting in a matrix showing only the difference between the two steps.

3.4.6 Statistical analysis

T1 and T2 data were compared using a Kruskal-Wallis test. The whole tests were then merged and re-compared using mean and standard deviation. Significance level was set to $p < 0.05$.

3.5 Results

The compression of the IVD did not lead to any significant change of the MRI parameters.

T1 did not show any particular trend, neither in AF nor NP (fig. 1). The trend lines showed a very flat shape. The envelopes (fig. 2) showed a very similar distribution as illustrated by the median and quartiles (fig. 3). The discs presented a similar area between quartiles and the median was globally on the same line.

T2 (fig. 4) was quite similar to T1 for the AF, but showed a slight increase for the NP located on the 5% and 10%. The envelopes (fig. 5) and the distribution in terms of median and quartiles (fig. 6) showed a very similar form.

MTR and ADC did not show any significant differences between the three loading stages (fig. 7).

The projection of the FA-3D vectors showed a change of diffusion in the Z direction, and no real changes on X and Y axis (Fig 8).

3.6 Discussion

The first objective that consisted of making an apparatus functional to apply compression and allow MRI images of the in-vitro compressed IVD to be acquired was successful. However, there was one drawback in the manufacturing of the apparatus using rapid tooling. Even if we used high-density presets, there were small air bubbles trapped inside the apparatus. Artifacts were simple to remove using two steps. The first step was a filter that removes all the high values (more than 2500ms in T1, 200ms in T2). The second step was not to use any zone with artifact into them. The compression was applied using the screw rotation calculated from traced guidelines on the upper plate, hence precise up to $\pm 1\%$, depending on the thickness of the disc.

The explanation for the trend to increase of T2 at 5% and 10% compression might be due to the compression process on these particular discs. The process tends to induce a slight rotation to the discs subjected to 5% and 10% compression and none to the discs subjected to 20% and 40%. For the 5% and 10% compression, the platens were bonded to the screws, hence transmitting the rotation movement of the screw to the discs. For the 20% and 40%, the platens were decoupled from the screws, so that there was no rotation movement transmitted to the discs.

The geometrical distortions arising from the use of an EPI readout for the diffusion sequence prevented us to use the same segmentation process as for the T1 and T2 maps. For the diffusion-derived measures (FA, FA-3D, ADC), directionality is modified alongside the compression, the water molecule within the disc tends to diffuse radially when the compression increases.

In this study, the IVDs were imaged just after the static compression was applied, thus they were not fully relaxed in semi-confined compression. The T1 map was acquired 10 minutes after the compression of the IVD, i.e. after 10 minutes of relaxation under semi- confined compression, while the T2 maps were acquired after 25 minutes, the MTR maps after 30 minutes and the diffusion maps after 35 minutes. We conclude that the relaxation times, the MTR and the diffusion parameters are not sensible to the semi-confined relaxation that follows the static compression of the IVD.

We found differences in the relaxation times between regions (annulus / nucleus) on the IVD as previously observed by Chui & al. [26]. However, they found differences between compressed/uncompressed discs on T1 and diffusion, but not on T2. The differences may be explained by the fact that they used human IVD and the sample preparation process. Mwale, & al. [8] found differences on T1, but neither on T2 nor MTR between hydrated loaded and hydrated unloaded discs. They used a whole section of the bovine tail to conduct the experiment and saline or trypsin was injected directly into the NP, hence finding a difference whereas we found none. Ludescher & al. [11] showed a difference in T2 and ADC between morning and evening, in vivo. Furthermore, it was shown that one hour of cyclic loading on one subject in vivo change the qMRI signal [27]. Our explanation is that, in vivo, there is a reorganization of the extracellular matrix and a movement of liquid that does not append in vitro.

3.7 Conclusion

This experimental in-vitro study shows that qMRI on isolated discs in vitro is not sensitive to static compression and partial relaxation.

3.8 Acknowledgements

The NSERC (discovery grant), the Mechanical Engineering department and the

1. Mwale, F., J.C. Iatridis, and J. Antoniou, Quantitative MRI as a diagnostic tool of intervertebral disc matrix composition and integrity. *Eur Spine J*, 2008. 17 Suppl 4: p. 432-40.
2. Fragonas, E., et al., Correlation between biochemical composition and magnetic resonance appearance of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998. 6(1): p. 24-32.
3. Terti, M., et al., Disc degeneration in magnetic resonance imaging. A comparative biochemical, histologic, and radiologic study in cadaver spines. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1991. 16(6): p. 629-34.
4. Lusse, S., et al., Evaluation of water content by spatially resolved transverse relaxation times of human articular cartilage. *Magn Reson Imaging*, 2000. 18(4): p. 423-30.
5. Antoniou, J., et al., Quantitative magnetic resonance imaging in the assessment of degenerative disc disease. *Magn Reson Med*, 1998. 40(6): p. 900-7.
6. Antoniou, J., et al., Apparent diffusion coefficient of intervertebral discs related to matrix composition and integrity. *Magn Reson Imaging*, 2004. 22(7): p. 963-72.
7. Krueger, E.C., et al., Changes in T2 relaxation times associated with maturation of the human intervertebral disk. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2007. 28(7): p. 1237-41.
8. Mwale, F., et al., Evaluation of quantitative magnetic resonance imaging, biochemical and mechanical properties of trypsin-treated intervertebral discs under physiological compression loading. *J Magn Reson Imaging*, 2008. 27(3): p. 563-73.
9. Borthakur, A., et al., T1rho MRI and Discography Pressure as Novel Biomarkers for Disc Degeneration and Low Back Pain. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011.
10. Campana, S., et al., Relationships between viscoelastic properties of lumbar intervertebral disc and degeneration grade assessed by MRI. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2011. 4(4): p. 593-9.
11. Ludescher, B., et al., T2- and diffusion-maps reveal diurnal changes of intervertebral disc composition: an in vivo MRI study at 1.5 Tesla. *J Magn Reson Imaging*, 2008. 28(1): p. 252-7.
12. Recht, M.P., et al., MRI of articular cartilage: revisiting current status and

future directions. *AJR Am J Roentgenol*, 2005. 185(4): p. 899-914.

13. Samosky, J.T., et al., Spatially-localized correlation of dGEMRIC-measured GAG distribution and mechanical stiffness in the human tibial plateau. *J Orthop Res*,

2005. 23(1): p. 93-101.

14. Chen, C.T., et al., Matrix fixed-charge density as determined by magnetic

resonance microscopy of bioreactor-derived hyaline cartilage correlates with biochemical and biomechanical properties. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(4): p. 1047-56.

15. Kurkijarvi, J.E., et al., Delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) and T2 characteristics of human knee articular cartilage: topographical variation and relationships to mechanical properties. *Magn Reson Med*, 2004. 52(1): p. 41-6.

16. Nieminen, M.T., et al., Prediction of biomechanical properties of articular cartilage with quantitative magnetic resonance imaging. *J Biomech*, 2004. 37(3): p. 321-8.

17. Lammentausta, E., et al., T2 relaxation time and delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) of human patellar cartilage at 1.5 T and 9.4 T: Relationships with tissue mechanical properties. *J Orthop Res*, 2006. 24(3): p. 366-74.

18. Wheaton, A.J., et al., Quantification of cartilage biomechanical and biochemical properties via T1rho magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*, 2005. 54(5): p. 1087-93.

19. Nguyen, A.M., et al., Noninvasive quantification of human nucleus pulposus pressure with use of T1rho-weighted magnetic resonance imaging. *J Bone Joint Surg Am*, 2008. 90(4): p. 796-802.

20. Perie, D., et al., Assessment of compressive modulus, hydraulic permeability and matrix content of trypsin-treated nucleus pulposus using quantitative MRI. *J Biomech*, 2006. 39(8): p. 1392-400.

21. Costi, J.J., et al., Direct measurement of intervertebral disc maximum shear strain in six degrees of freedom: motions that place disc tissue at risk of injury. *J Biomech*, 2007. 40(11): p. 2457-66.

22. Wright, P.J., et al., Water proton T1 measurements in brain tissue at 7, 3, and 1.5 T using IR-EPI, IR-TSE, and MPRAGE: results and optimization. *MAGMA*, 2008. 21(1-2): p. 121-30.

23. Wang, C., et al., Magnetization transfer ratio mapping of intervertebral disc degeneration. *Magn Reson Med*, 2010. 64(5): p. 1520-8.
24. Henkelman, R.M., G.J. Stanisz, and S.J. Graham, Magnetization transfer in MRI: a review. *NMR Biomed*, 2001. 14(2): p. 57-64.
25. Le Bihan, D., et al., MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*, 1986. 161(2): p. 401-7.
26. Chiu, E.J., et al., Magnetic resonance imaging measurement of relaxation and water diffusion in the human lumbar intervertebral disc under compression in vitro. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001. 26(19): p. E437-44.
27. , D, Effect of loading on the MR parameters of human intervertebral discs in vivo, in *ORS*. 2011: Montréal.

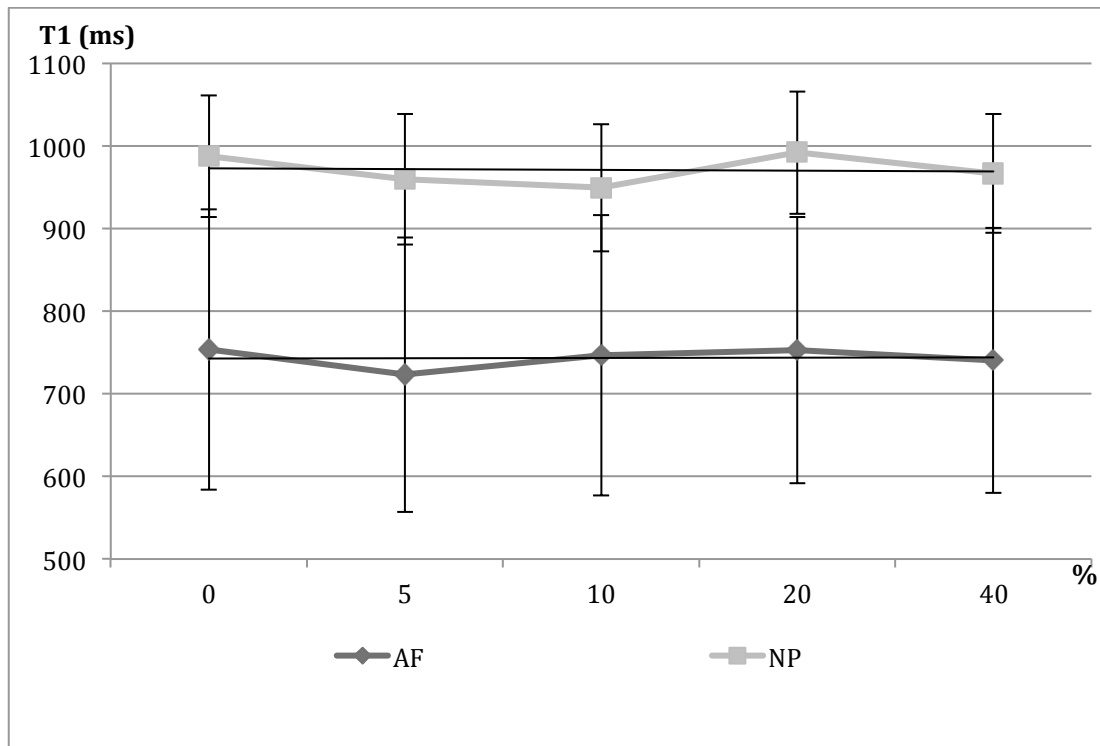


Fig. 1:

Global T1 means for AF and NP. The standard deviation and linear regression are represented.

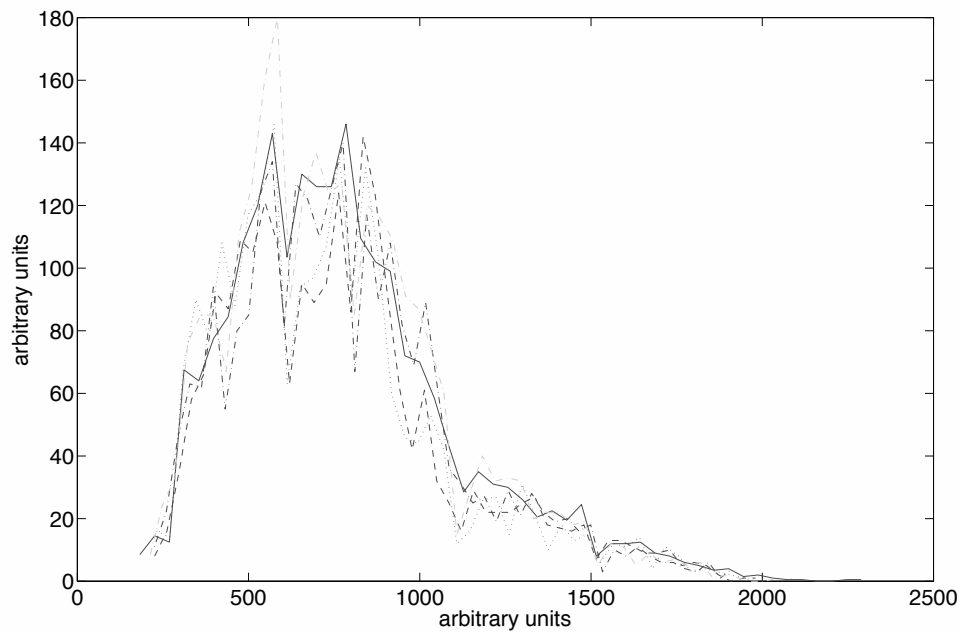


Fig. 2:

Distribution of T1 parameter across all discs. Plain line is 0%, dotted is 5%, dashed is 10%, dotted-dashed black is 20%, dotted-dashed gray is 40% compression. The arbitrary units are a representation of the number of voxel clusters of a particular T1 value. The distribution is calculated on the global AF + NP disc segmentation, separated in 25 clusters of voxels in order to have a representation, then the clusters are plotted against the value of T1 parameter.

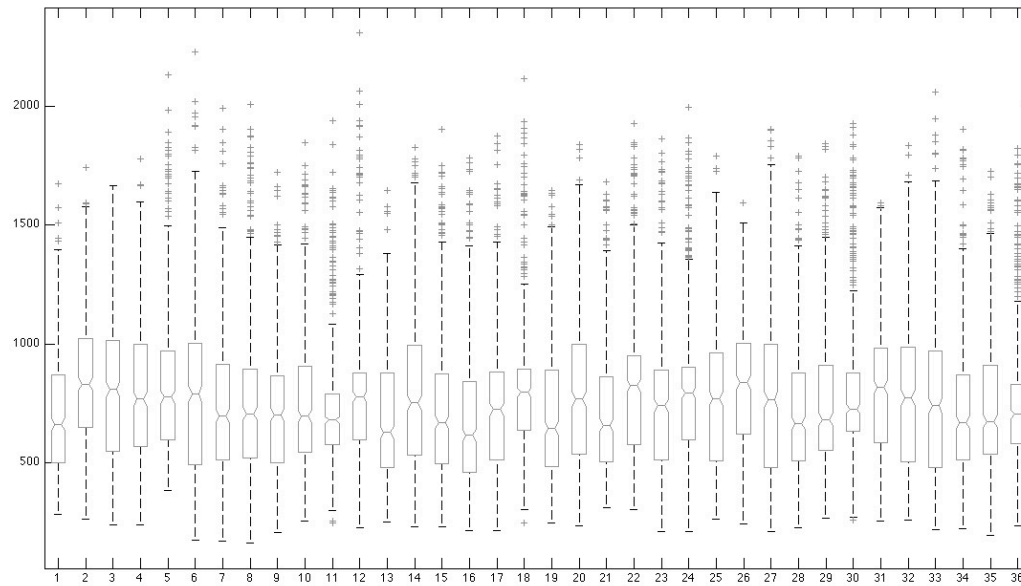


Fig. 3:

Global plot for the median, first and third quartile and extreme points taken in the statistical test. The first 12 plots are 0% discs, then the 6 followings are 5%, then 6 for 10%, then 6 for 20% and finally 6 for 40%.

The chains, representing a single disc subjected to compression steps are: for 0%-5%-10% (1-13-19), (3-14-20), (5-15-21), (7-16-22), (9-17-23), (11-18-24). For 0%-20%-40% (2-25-31), (4-26-32), (6-27-33), (8-28-34), (10-29-35), (12-30-26).

The points situated up of the upper whisker are considered outliers, are individually plotted and are excluded from the statistical analysis.

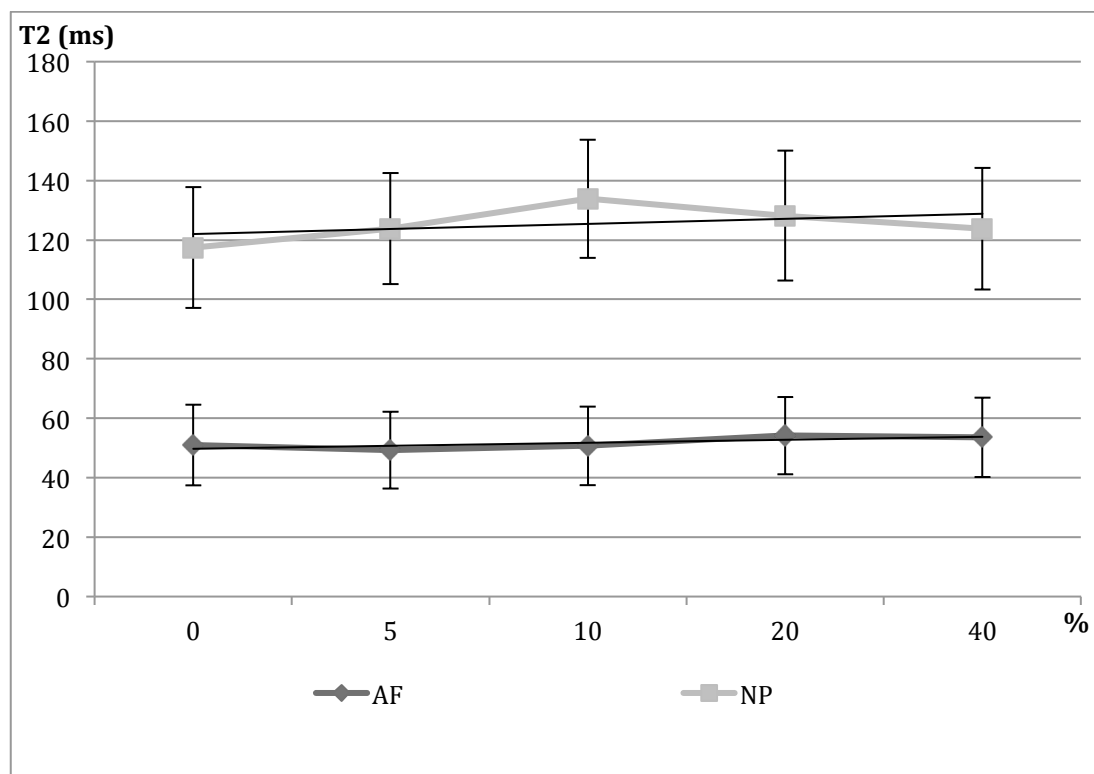


Fig. 4:

Global T2 means for AF and NP. The standard deviation and linear regression are represented.

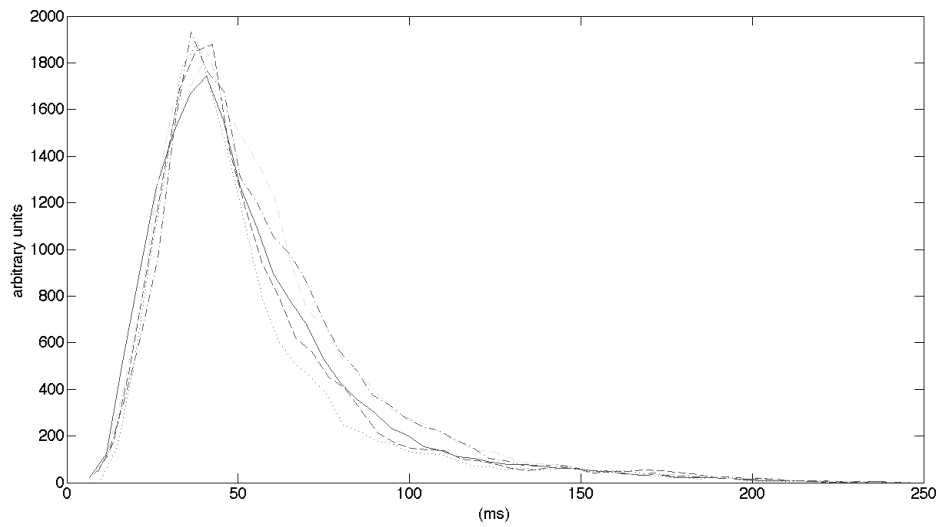


Fig 5:

Distribution of T2 parameter across all loading stages. Plain line is 0%, dotted is 5%, dashed is 10%, dotted-dashed black is 20%, dotted-dashed gray is 40% compression.

Arbitrary units are defined the same as on fig. 2.

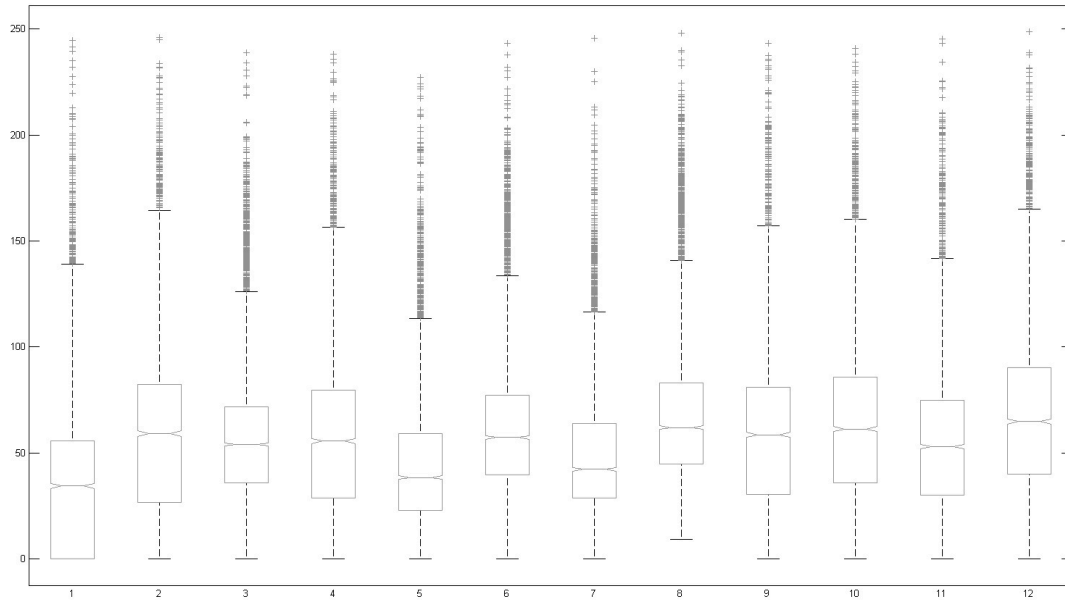


Fig. 6:

Global plot for the median, first and third quartile.). The points above the upper/lower whisker are considered outliers and are individually plotted. This particular picture only shows one test on 4 discs. The 4 first are 0%, then 5%, then 10%, then 20% and last 40%. The chains are (1-5-7) & (2-6-8) for 0%-5%-10% and (3-9-11) & (4-10-12) for 0%-20%-40%.

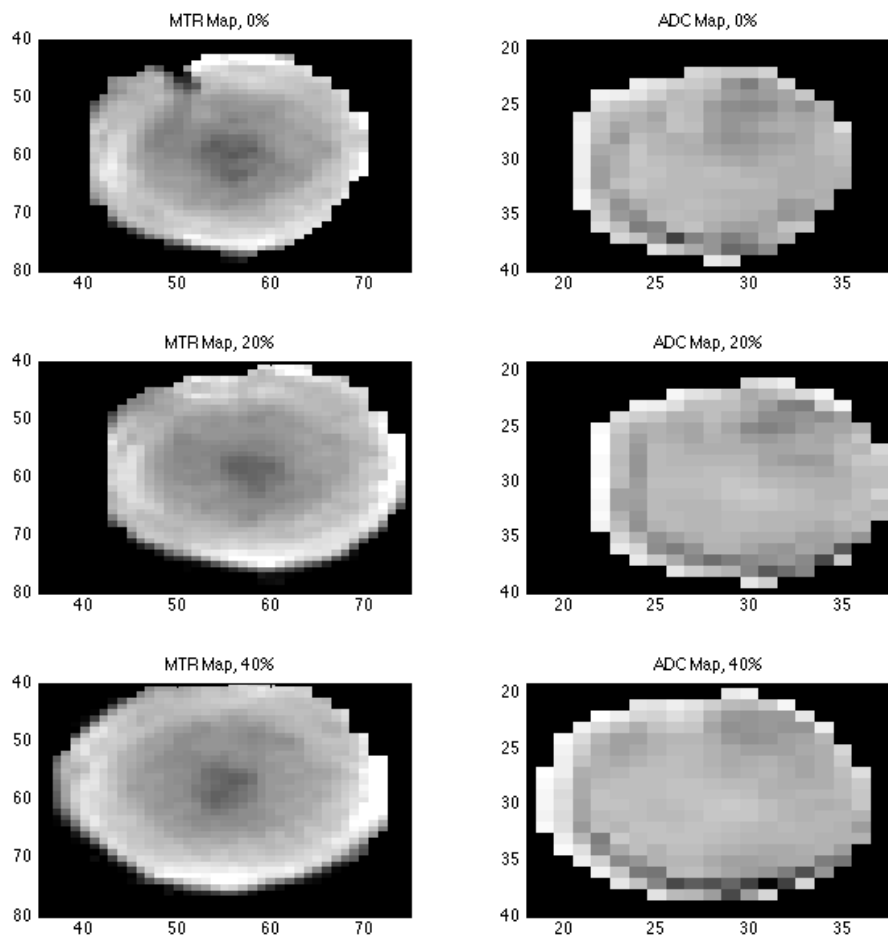


Fig. 7:

MTR & ADC mapping of one disc subjected to 0%, 20% and 40% compression. The units are the voxel location inside the slice of imaging.

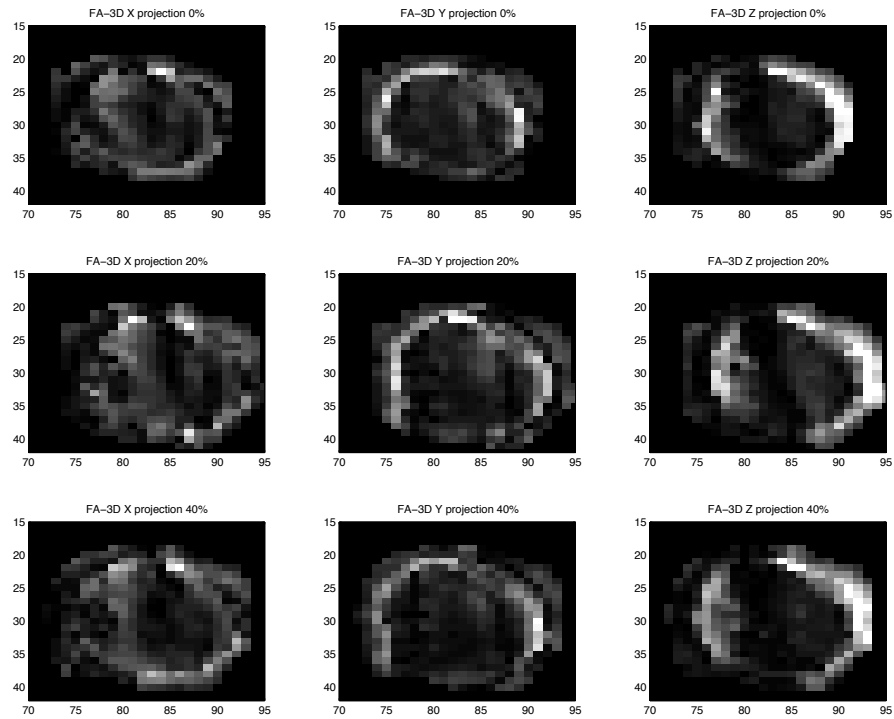


Fig. 8(a): Projected representation of FA vector on the 3 axis for one disc subjected to 0%, 20% and 40% of compression. The axes are the location of the disc into the image slice. Scale is consistent trough the images.

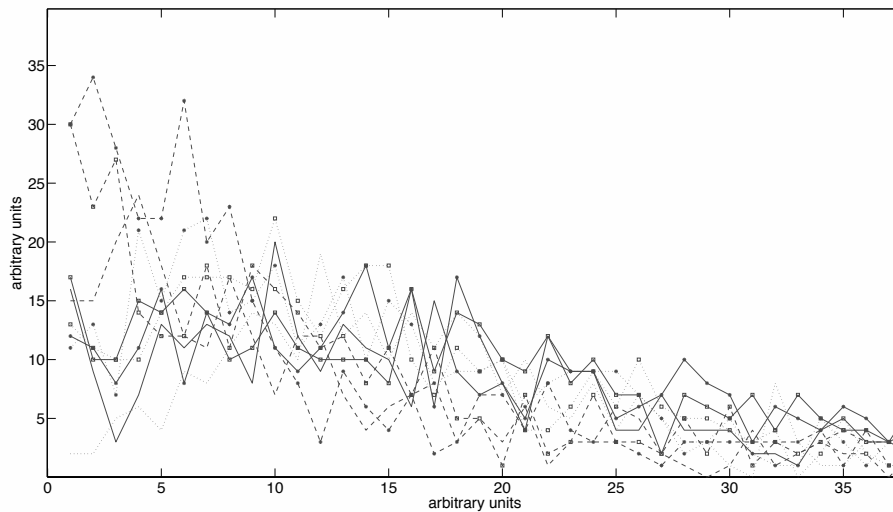


Fig. 8(b): Projected values plotted in arbitrary units against arbitrary units. The unit system is chosen so that the area contained under a specific curve reflects the projection of the FA vector on an axis. The lines with no marking are the 0% ones, the squares are the 20% and the stars are the 40%. The dashed lines are the x axis, the dotted the Y axis and the dashed-dotted the z axis.

CHAPITRE 4 ARTICLE 2: SENSITIVITY OF QUANTITATIVE MRI TO THE TRYPSIN DIGESTION OF ISOLATED INTERVERTEBRAL DISCS

Y.-G. Manac'h^{1,2}, G. Gilbert³, G. Beaudoin⁴, D. Perié^{1,2}

1 - Research Center, CHU St Justine, Montréal, QC Canada;

2 - Mechanical Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal, QC, Canada;

3 - Philips Healthcare, Montréal, QC, Canada;

4 - Physics and Biomechanical Engineering, CHUM Notre Dame, Montréal, QC, Canada

4.1 Présentation de l'article

La digestion du disque intervertébral a été abondamment étudiée, le plus souvent pour rechercher des corrélations entre paramètres IRM, propriétés biochimiques et comportement mécanique. L'hypothèse de ce travail est que les paramètres IRM sont modifiés significativement lors de la digestion du disque par la trypsine.

Cet article, intitulé « *Quantitative MRI study of trypsin treated isolated intervertebral discs* » a été soumis pour publication à la revue MRI en Août 2011. La contribution du premier auteur à la préparation et à la rédaction de l'article est évaluée à 75%.

4.2 Abstract

Objective: MRI parameters were found to be sensitive to the intervertebral disc (IVD) degeneration. Trypsin treatment reduces the content in proteoglycan and reduces osmotic pressure, with very few effects on collagen. Our specific aim is to measure the MRI relaxation times T1 and T2, the magnetization transfer ratio and the diffusion parameters (ADC and FA) on isolated bovine intervertebral discs in three different states, in-situ, hydrated and trypsin digested.

Methods: 59 discs from bovine tails were randomly separated in six groups: in-situ, hydrated in saline solution for 6h or 18h, digested in trypsin solution for 6h, 18h or 24h. The MRI acquisition

was performed immediately after the hydration or digestion process. The six groups were compared using t-tests or Mann-Whitney tests

Results: For both the annulus and nucleus, there were no significant changes on T1 or T2 between in-situ and digested discs. However, significant differences were found between in-situ and hydrated discs, and between digested and hydrated discs. For FA, significant differences were found between all groups within the annulus.

Discussion: The diffusion parameters are more sensitive to the trypsin digestion of isolated discs than the relaxation times T1 and T2. However, these parameters are sensitive to the hydration process. We recommend that future work on trypsin enzymatically digested intervertebral discs uses diffusion parameters instead of T1 and T2.

4.3 Introduction

MRI has been proposed as an early diagnostic tool for multiple pathologies, including the intervertebral disc (IVD) degeneration. Water, proteoglycan and collagen contents of the IVD were found to be correlated to the longitudinal relaxation time (T1), the transversal relaxation time (T2), the magnetization transfer ratio (MTR) and the diffusion [1-6]. The Thompson grade increase can be correlated to T1 and T2 decrease [2, 5, 7]. ADC (apparent diffusion coefficient) shows a similar comportment, it decreases when the Thompson grade increases, and also when the loading of the discs increases [7, 8]. The MTR sequences are also sensitive to the Thompson grade evolution [2]. Furthermore, MT sequences are sensitive to the modification of the extracellular matrix structure and fiber organization [5]. The anisotropy factor tends as well to increase when the disc is undergoing a loss of integrity, hence showing this loss is direction dependent [9].

Quantitative MRI is also used to estimate indirectly the mechanical properties of joint tissues, especially when they are degenerated [5, 9-11]. The MRI parameter found to be linked to the mechanical properties of the intervertebral disc are the spin-lock relaxation time T1 ρ [12-14] and the diffusion parameters [15-17]. These parameters were also found to be sensitive to the disc degeneration.

Trypsin, a mammal protease, cleave the proteoglycan core protein [18]. It catalyzes the hydrolysis of peptide bonds at the carboxyl side of lysyl and arginyl residues [19]. Trypsin is

shown to have very few effects on collagen [6]. Trypsin treatment reduces the content in proteoglycan and reduces osmotic pressure [20-22].

Our hypothesis is that quantitative MRI is sensitive to changes induced by the trypsin treatment of isolated IVDs. Our specific aim is to measure the MRI relaxation times T1 and T2, the magnetization transfer ratio and the diffusion parameters on isolated bovine intervertebral discs in three different states, in-situ, hydrated and trypsin digested.

4.4 Methods

4.4.1 Sample preparation

Bovine tails were obtained from a local slaughterhouse (Viandes Forget, Terrebonne, QC, Canada) within 4 hours of death. The two proximal discs were harvested from each tail and 59 discs were randomly separated in six groups: in-situ, hydrated 6h, hydrated 18h, digested 6h, digested 18h and digested 24h. The discs from the in-situ group (n=12) were wrapped in plastic to prevent dehydration. The discs from the hydrated 6h (n=5) and hydrated 18h (n=7) groups were hydrated for respectively 6h and 18h in PBS (phosphate buffered saline) solution at ambient temperature. The discs from the digested 6h (n=11), digested 18h (n=12) and digested 24h (n=12) were digested in PBS solution with 5mg/ml of trypsin from bovine pancreas (T8003 Sigma-Aldrich) for respectively 6h, 18h and 24h at 37°C with shaking. A light platen of plastic was placed on the top of the disc to avoid bulging during the hydration and the digestion.

4.4.2 MR Imaging

Immediately after the hydration or digestion process, the discs were removed from the bath and gently blotted. Thickness and weight were measured for all discs just before the MR acquisition. The MR acquisition was performed using a 3T whole-body system (Philips Achieva X-Series) with a head coil. Images for the quantification of T1 and T2 were acquired using a multiple inversion recovery turbo spin-echo (TSE) sequence for T1 (TR/TE=2100/6.3ms, 15 inversions times TI from 50ms to 1900ms) and a multiple-echo turbo spin-echo (TSE) sequence

for T2 (TR=2000ms, 10 TE every 15ms). T1 and T2 were extracted (Matlab r2010b/r2011a, Mathworks, Natick, MA) from the signal intensity (SI) by non-linear regressions to the equations (1) & (2) [23].

$$(1) SI_{TI} = S_0 \left[1 - (1 - \cos(\alpha)) E_{TI} \left(1 - E_{TW} f^N \left(1 - \frac{E_{TE/2}}{2} \right) \right) \right]$$

With α the refocusing angle, $f(x) = 1 - E_{TE}x$, $E_{TI} = e^{-T1/T1}$, $E_{TW} = e^{-TW/T1}$, $E_{TE} = e^{-TE/T1}$ & $N = 8$

$$(2) SI_{TE} = SI_{(TE=0)} e^{-TE/T2}$$

Where SI is the signal intensity, TW the time in ms between the last refocusing pulse and the next inversion pulse and N is the number of refocusing pulses.

The last sequence measures the ADC and the fractional anisotropy (FA) using a spin-echo EPI diffusion weighted sequence (TR/TE=2000/40ms) with 15 non-collinear diffusion and a b value of 1000 mm². ADC and FA were calculated using equation (4-6) [24-26].

$$(4) SI_{(b)} = SI_{(b=0)} e^{-bD}$$

$$(5) ADC = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3}$$

$$(6) F_A = \sqrt{\frac{3[(\lambda_1 - ADC)^2 + (\lambda_2 - ADC)^2 + (\lambda_3 - ADC)^2]}{2(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2)}}$$

Where b is the diffusion encoding tensor, D is the diffusion tensor and λ are the eigenvalues of D.

4.4.3 Data analysis

The results were extracted using a custom in-house program allowing the segmentation of the discs on the T1 quantitative images. Theses ROI masks were then resized to fit the T2, ADC and FA images for segmentation.

T1 was smoothed out at 2000ms, and T2 at 250ms. We decided to use these values, which are roughly 1.5x the max value we found into the image on non deviant pixels.

Two means and standard deviations were extracted for each disc, one for the nucleus pulposus (NP) and one for the annulus fibrosus (AF).

4.4.4 Statistical analyses

The six groups were compared using t-tests or Mann-Whitney tests if the normality test failed.

The significance level was placed at $p < 0.05$ and all results were expressed as Mean \pm SD.

4.5 Results

For both the AF and NP, there were no significant changes on T1 (fig. 1a and 1b) between in-situ and digested discs. However, significant differences were found between in-situ and hydrated discs, and between digested and hydrated discs ($p < 0.001$). T1 decreased from the in-situ to the hydrated groups, but increased from the hydrated to the digested groups. T2 showed a similar trend as T1 within the NP (fig 2a) with significant differences between in-situ and hydrated discs and between hydrated and digested discs, but not between in-situ and digested discs. However, within the AF, no significant differences were found between all groups (fig. 2b). A slight decrease was observed for the digested groups as compared to the in-situ and hydrated groups.

For ADC within the NP, there were no significant differences between all groups, except between the digested 24h group and the others (fig 3a). Within the AF, no significant differences were found (fig 3b).

For FA within the NP, no significant differences were found between all groups, except between the digested 6h group and the other (fig 4a). Within the AF, nearly all groups were statistically different from one-another ($p < 0.01$) (fig. 4b).

4.6 Discussion

Quantitative MRI acquisition was performed for the first time to our knowledge on isolated bovine IVDs in three different states: in-situ, hydrated and trypsin digested. Isolated IVDs soaked in a trypsin solution was efficient to degenerate discs, as it resulted in a GAG decrease in the NP and an alteration of the structure in both AF and NP (unpublished data). The GAG content for the hydrated discs did not change, according to the literature [27].

However, enzyme digestion of the isolated intervertebral disc is different from the *in vivo* degeneration. Enzyme digestion concerns only proteoglycan or collagen cleaving in order to create matrix composition changes [28]. As IVDs degenerate, the NP becomes more consolidated and fibrous, and is less clearly demarcated from the AF in which focal defects appear and there is a decrease in the number of layers [29, 30]. Compositionally, degeneration results in a decrease in proteoglycan and water content in both AF and NP, whereas the collagen content remains relatively constant in the NP and decreases in the AF with a change in the distribution of types I and II collagen [31-35]. Enzyme digestion is not representative of *in vivo* degeneration because of the water content, which increases with enzyme digestion and decreases with degeneration. However, the aim of this study was not to test the sensitivity of quantitative MRI to *in vivo* degeneration, but to two isolated phenomenon, hydration and trypsin digestion.

The sensitivity of the MRI parameters to the trypsin digestion is in agreement with a previous study [18]. Both T1 and T2 did not present any significant differences between in-situ and trypsin digested groups. However, the significant decrease of both T1 and T2 between the in-situ and hydrated groups, and the increase between the hydrated and digested groups, increase up to the values of the in-situ group, might be explained by the cleaving of the proteoglycan core protein residues that acts as a contrast agent for both T1 and T2. Hydration has a significant effect on both T1 and T2, but the trypsin digestion removes this effect.

No differences were observed for ADC between all groups, according to Mwale & al [18], excepted for the digested 24h groups for the AF and the digested 6h group for the NP, according to Antoniou & al. [6]. These different results from Antoniou & al. and Mwale & al. might be explained by the treatment time, Mwale & al. treated the discs for 16 hours on dissected segments of three discs whereas Antoniou & al did it for 13 hours on paraffin-enrobed discs.

The lack of differences between all groups for the FA in the NP might be explained by small structural changes within the collagen network as compared to the AF where significant differences were observed between all groups. Within the AF, the collagen fibers are highly organized and tighten together. The cleaving of the proteoglycans might modify the orientation of the fibers. However, within the NP, the collagen fibers are disorganized and free within the extracellular water. The cleaving of the proteoglycans might not have any influence. Hydration increases FA, i.e. increase the anisotropy, while trypsin digestion decreases FA, i.e. decrease the anisotropy of the tissue.

All the analyses were performed using the segmentation created on the T1 images, then rescaled to the other images if they did not present the same resolution. That may have induced some artifact due to the scaling that we have removed using Gaussian filtering, and excluding most of them in the final segmentation. As all these segmentation steps are fully automated, they are reproducible with the exact same results.

4.7 Conclusion

The diffusion parameters are more sensitive to the trypsin digestion of isolated discs than the relaxation times T1 and T2. However, these parameters are sensitive to the hydration process. We recommend that future work on trypsin enzymatically digested intervertebral discs uses diffusion parameters instead of T1 and T2.

1. Antoniou, J., et al., Apparent diffusion coefficient of intervertebral discs related to matrix composition and integrity. *Magn Reson Imaging*, 2004. 22(7): p. 963-72.
2. Paajanen, H., et al., Magnetization transfer imaging of lumbar disc degeneration. Correlation of relaxation parameters with biochemistry. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1994. 19(24): p. 2833-7.
3. Toffanin, R., et al., Proteoglycan depletion and magnetic resonance parameters of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys*, 2001. 390(2): p. 235-42.
4. Laurent, D., et al., Quantitative and qualitative assessment of articular cartilage in the goat knee with magnetization transfer imaging. *Magn Reson Imaging*, 2001. 19(10): p. 1279-86.
5. Antoniou, J., et al., Quantitative magnetic resonance imaging in the assessment of degenerative disc disease. *Magn Reson Med*, 1998. 40(6): p. 900-7.
6. Antoniou, J., et al., Quantitative magnetic resonance imaging of enzymatically induced degradation of the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006. 31(14): p. 1547-54.
7. Chiu, E.J., et al., Magnetic resonance imaging measurement of relaxation and water diffusion in the human lumbar intervertebral disc under compression in vitro. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001. 26(19): p. E437- 44.
8. Kurunlahti, M., et al., Correlation of diffusion in lumbar intervertebral disks with occlusion of lumbar arteries: a study in adult volunteers. *Radiology*, 2001. 221(3): p. 779-86.
9. Kerttula, L., et al., Apparent diffusion coefficients and T2 relaxation time measurements to evaluate disc degeneration. A quantitative MR study of young patients with previous vertebral fracture. *Acta Radiol*, 2001. 42(6): p. 585-91.
10. Nissi, M.J., et al., Proteoglycan and collagen sensitive MRI evaluation of normal and degenerated articular cartilage. *J Orthop Res*, 2004. 22(3): p. 557-64.
11. Marinelli, N.L., et al., T2 relaxation times of intervertebral disc tissue correlated with water content and proteoglycan content. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2009. 34(5): p. 520-4.
12. O'Connell, G.D., E.J. Vresilovic, and D.M. Elliott, Human intervertebral disc internal strain in compression: the effect of disc region, loading position, and degeneration. *J Orthop Res*, 2011. 29(4): p. 547-55.

13. Borthakur, A., et al., T1rho MRI and Discography Pressure as Novel Biomarkers for Disc Degeneration and Low Back Pain. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011.
14. Nguyen, A.M., et al., Noninvasive quantification of human nucleus pulposus pressure with use of T1rho- weighted magnetic resonance imaging. *J Bone Joint Surg Am*, 2008. 90(4): p. 796-802.
15. Beattie, P.F., et al., The change in the diffusion of water in normal and degenerative lumbar intervertebral discs following joint mobilization compared to prone lying. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2009. 39(1): p. 4-11.
16. Beattie, P.F., P.S. Morgan, and D. Peters, Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of normal and degenerative lumbar intervertebral discs: a new method to potentially quantify the physiologic effect of physical therapy intervention. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2008. 38(2): p. 42-9.
17. Ludescher, B., et al., T2- and diffusion-maps reveal diurnal changes of intervertebral disc composition: an in vivo MRI study at 1.5 Tesla. *J Magn Reson Imaging*, 2008. 28(1): p. 252-7.
18. Mwale, F., et al., Evaluation of quantitative magnetic resonance imaging, biochemical and mechanical properties of trypsin-treated intervertebral discs under physiological compression loading. *J Magn Reson Imaging*, 2008. 27(3): p. 563-73.
19. Berg, A., T. Singer, and E. Moser, High-resolution diffusivity imaging at 3.0 T for the detection of degenerative changes: a trypsin-based arthritis model. *Invest Radiol*, 2003. 38(7): p. 460-6.
20. Urban, J.P. and J.F. McMullin, Swelling pressure of the lumbar intervertebral discs: influence of age, spinal level, composition, and degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1988. 13(2): p. 179-87.
21. Yao, H., et al., Effects of swelling pressure and hydraulic permeability on dynamic compressive behavior of lumbar annulus fibrosus. *Ann Biomed Eng*, 2002. 30(10): p. 1234-41.
22. Frank, E.H., et al., Streaming potentials: a sensitive index of enzymatic degradation in articular cartilage. *J Orthop Res*, 1987. 5(4): p. 497-508.

23. Wright, P.J., et al., Water proton T1 measurements in brain tissue at 7, 3, and 1.5 T using IR-EPI, IR- TSE, and MPRAGE: results and optimization. *MAGMA*, 2008. 21(1-2): p. 121-30.
24. Le Bihan, D., et al., MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*, 1986. 161(2): p. 401-7.
25. Kingsley, P.B., Introduction to diffusion tensor imaging mathematics: Part I. Tensors, rotations, and eigenvectors. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 2006. 28A(2): p. 101-122.
26. Kingsley, P.B., Introduction to diffusion tensor imaging mathematics: Part II. Anisotropy, diffusion- weighting factors, and gradient encoding schemes. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 2006. 28A(2): p. 123-154.
27. Korecki, C.L., J.J. MacLean, and J.C. Iatridis, Characterization of an in vitro intervertebral disc organ culture system. *Eur Spine J*, 2007. 16(7): p. 1029-37.
28. Lotz, J.C. and J.A. Ulrich, Innervation, inflammation, and hypermobility may characterize pathologic disc degeneration: review of animal model data. *J Bone Joint Surg Am*, 2006. 88 Suppl 2: p. 76-82.
29. Cassidy, J.J., A. Hiltner, and E. Baer, Hierarchical structure of the intervertebral disc. *Connect Tissue Res*, 1989. 23(1): p. 75-88.
30. Thompson, J.P., et al., Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1990. 15(5): p. 411-5.
31. Antoniou, J., et al., The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest*, 1996. 98(4): p. 996-1003.
32. Brickley-Parsons, D. and M.J. Glimcher, Is the chemistry of collagen in intervertebral discs an expression of Wolff's Law? A study of the human lumbar spine. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1984. 9(2): p. 148-63.
33. Buckwalter, J.A., Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1995. 20(11): p. 1307-14.
34. Roughley, P.J., et al., Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage. *Biochem J*, 1993. 295 (Pt 2): p. 421-6.

35. Takahashi, T., et al., Chemonucleolytic effects of chondroitinase ABC on normal rabbit intervertebral discs. Course of action up to 10 days postinjection and minimum effective dose. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1996. 21(21): p. 2405-11.

List of figures:

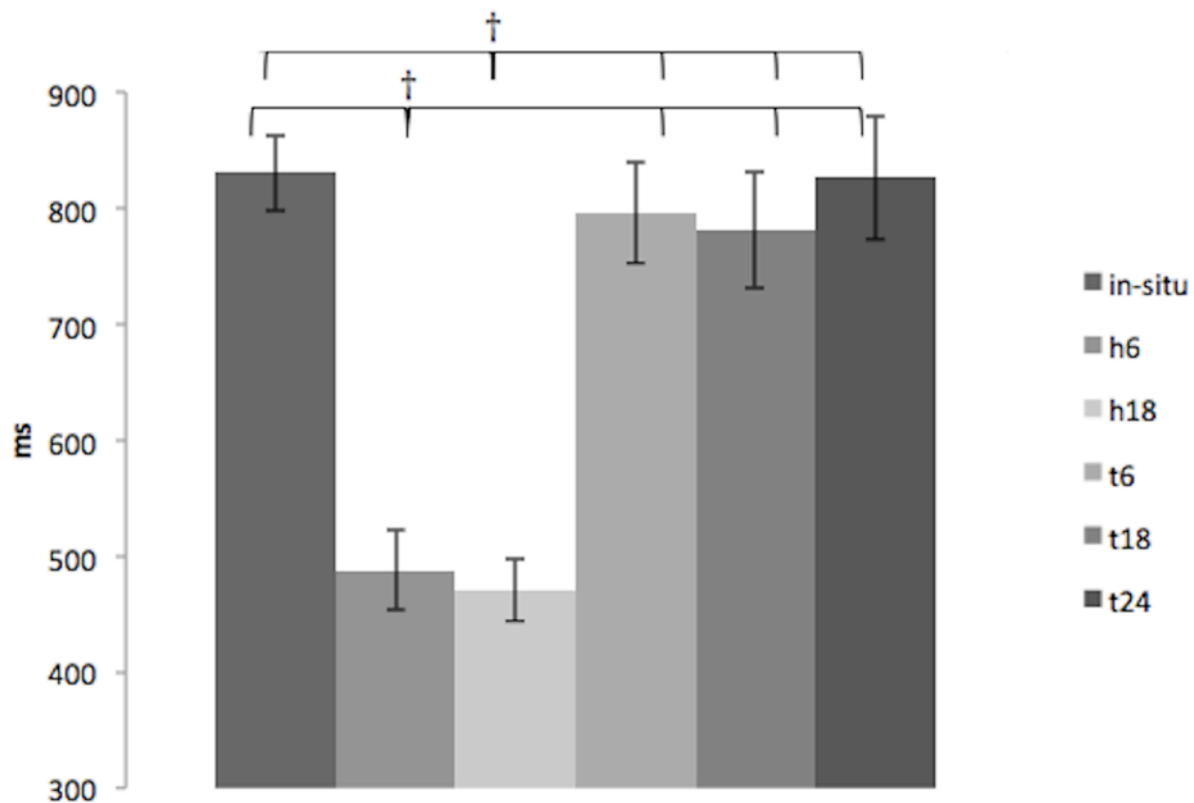
Figure 1: T1 mean and standard deviation in the nucleus (a) and in the annulus (b). † indicate $p < 0.01$. The hydrated groups are identified as h6 and h18, and the trypsin digested groups are identified as t6, t18 and t24.

Figure 2: T2 mean and standard deviation T2 in nucleus (a) and in the annulus (b). Brackets indicate $p < 0.01$. The hydrated groups are identified as h6 and h18, and the trypsin digested groups are identified as t6, t18 and t24.

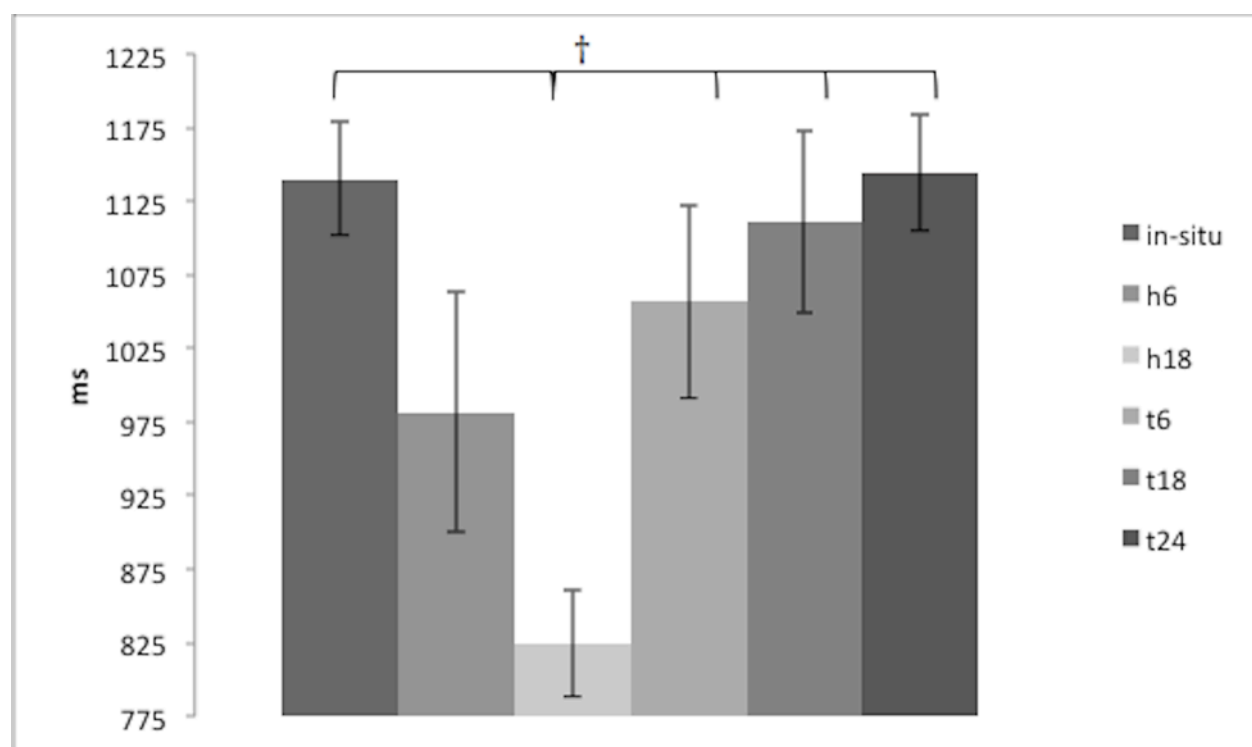
Figure 3: ADC mean and standard deviation in the nucleus (a) and in the annulus (b). Brackets indicate $p < 0.01$. The hydrated groups are identified as h6 and h18, and the trypsin digested groups are identified as t6, t18 and t24.

Figure 4: FA mean and standard deviation in the nucleus (a) and in the annulus (b). Brackets indicate $p > 0.01$, the convention is reversed from the other figures. The hydrated groups are identified as h6 and h18, and the trypsin digested groups are identified as t6, t18 and t24.

Figure 1

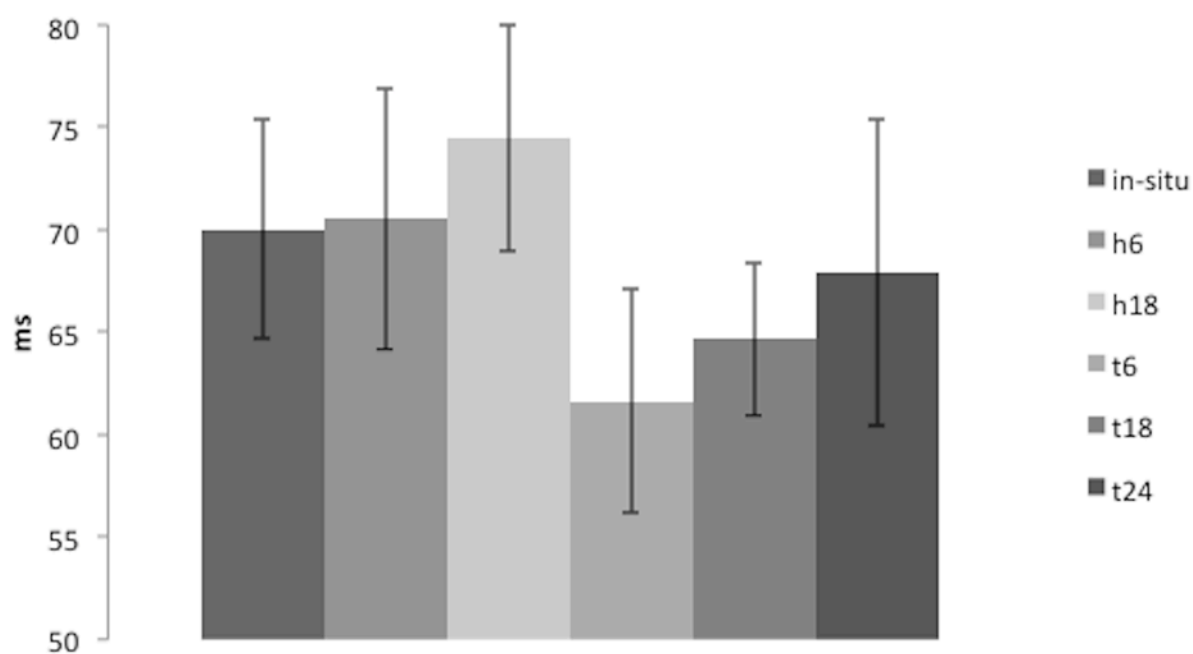


a



b

Figure 2



a

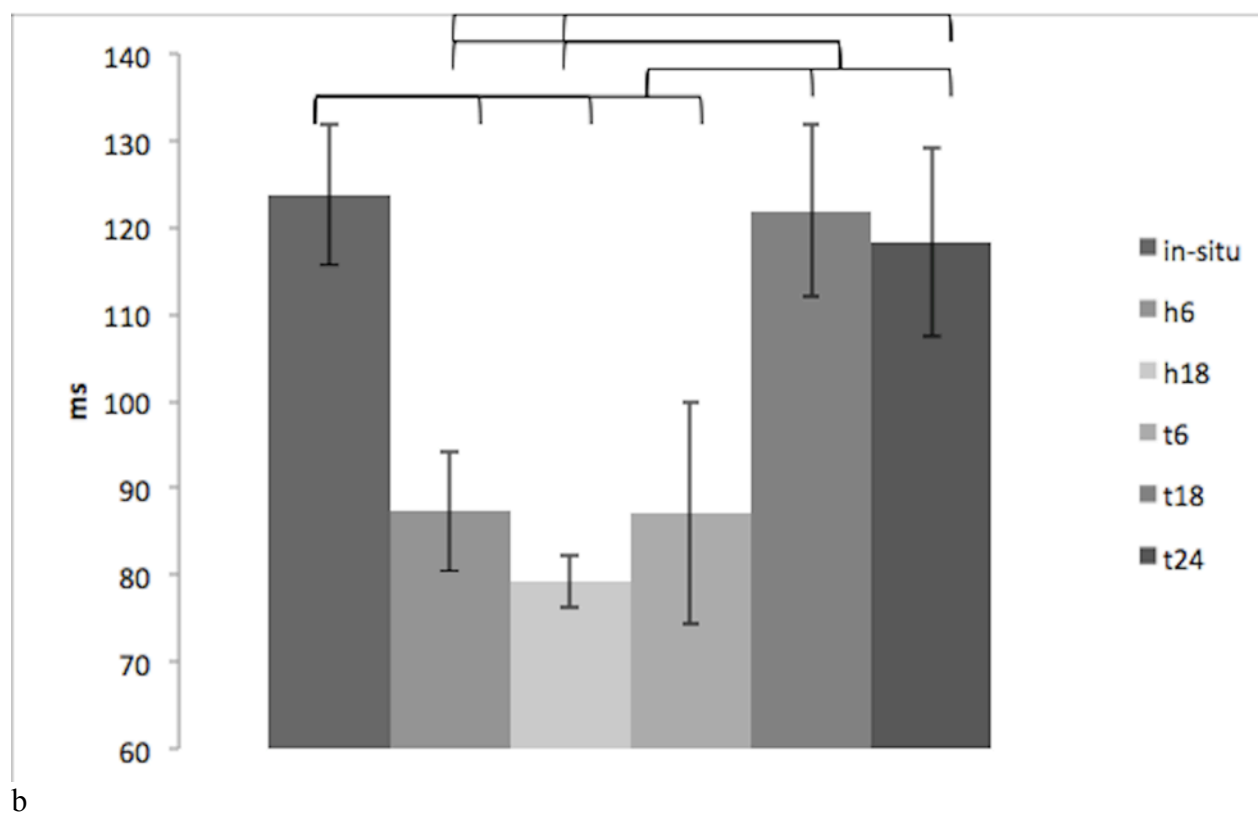
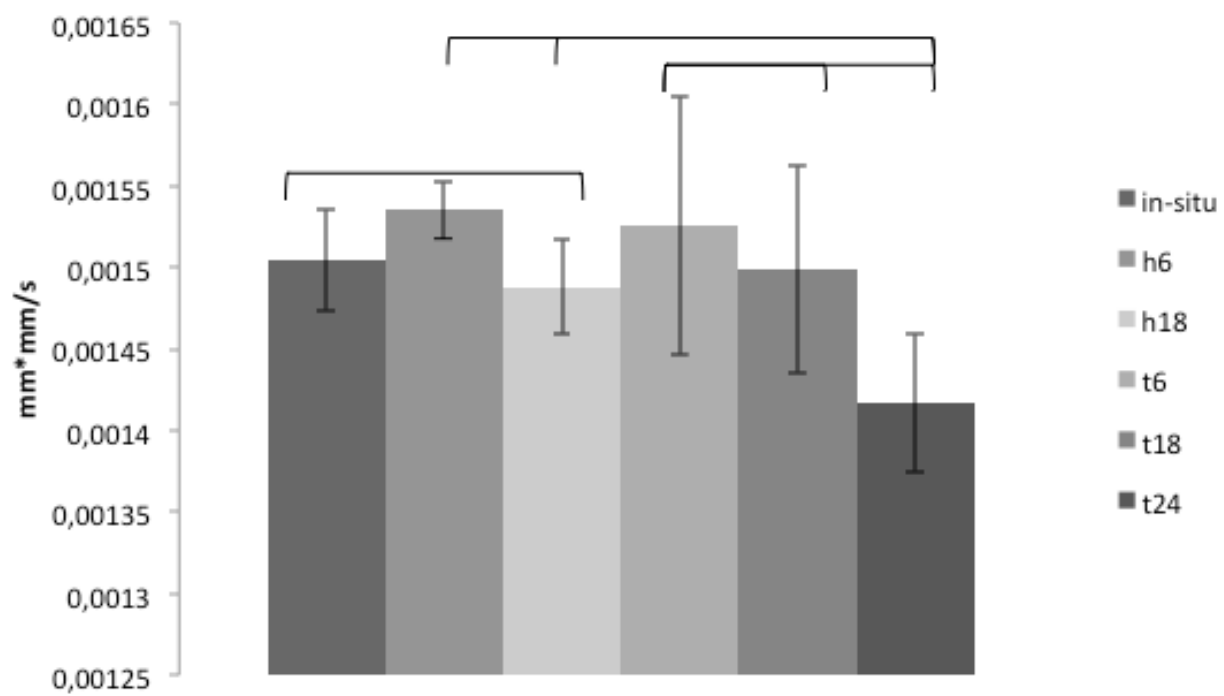
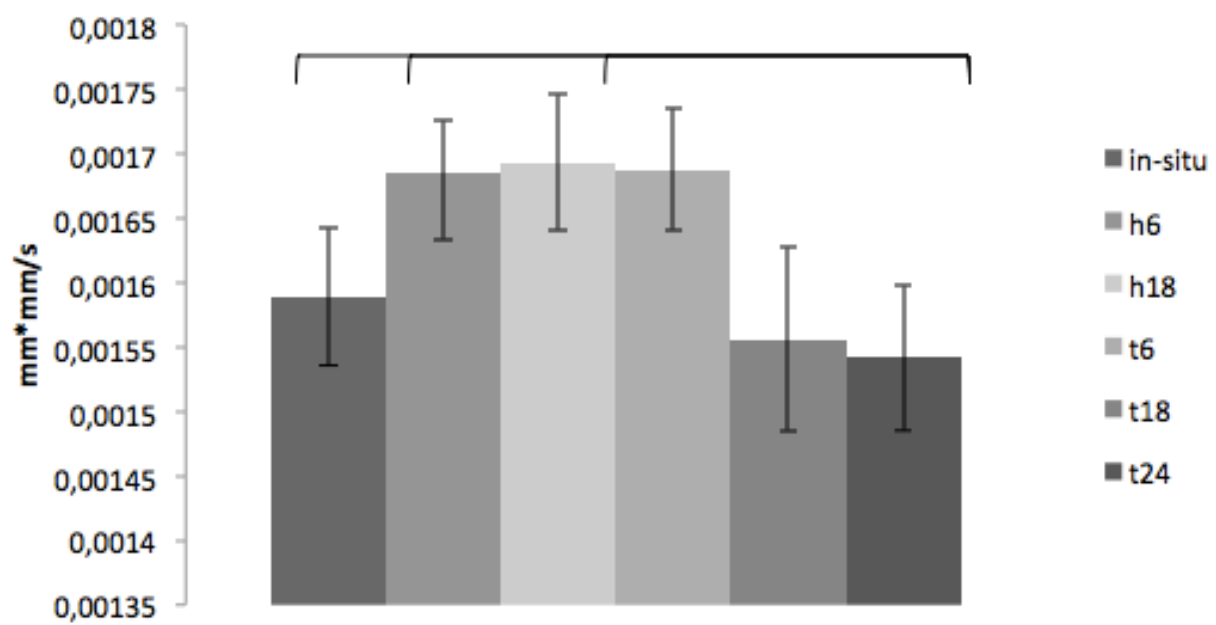


Figure 3

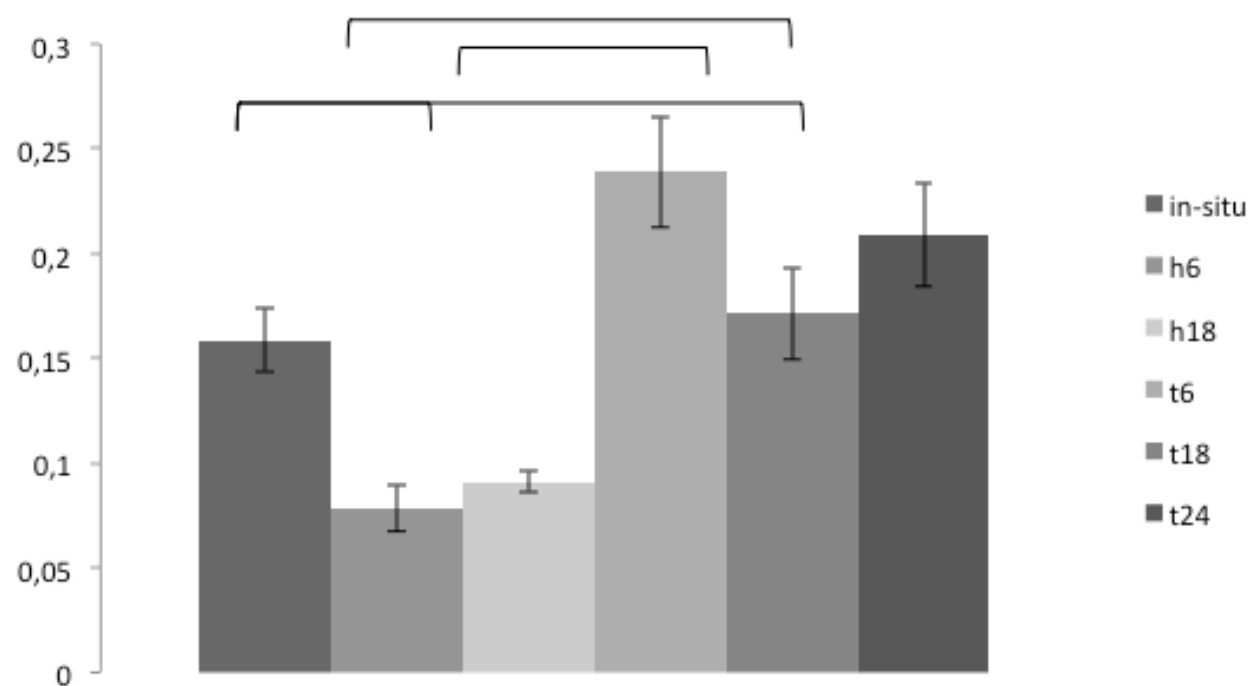


a

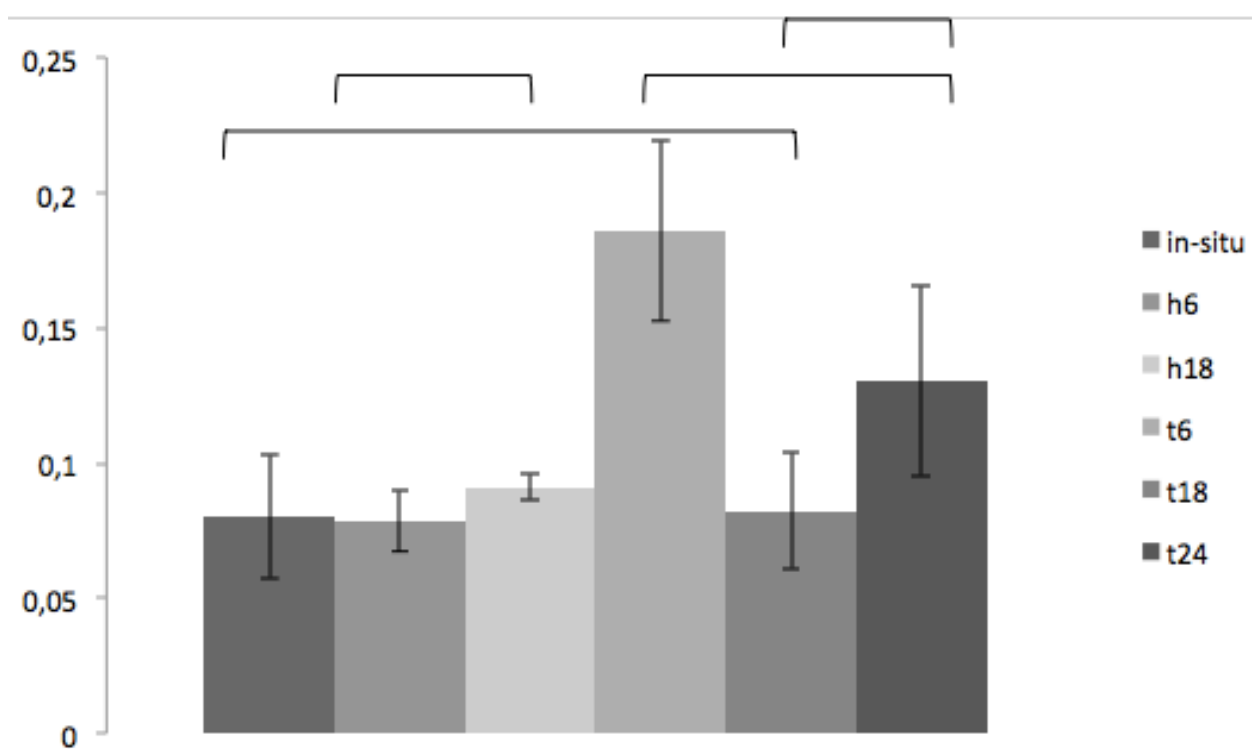


b

Figure 4



a



b

CHAPITRE 5 COMPLÉMENTS SUR LA SEGMENTATION DES DISQUES

5.1 Choix du type de segmentation

Le disque isolé est assez facilement segmentable à la main car les images IRM obtenues dans notre cas présentent un bon contraste, permettent une bonne détection de l'annulus et du nucleus. Cependant, la segmentation manuelle n'est pas reproductible inter-observateur. Une segmentation de type automatique est parfaitement répétable sur chacun des disques, quel que soit l'opérateur et la machine utilisée (différence de contraste et de luminosité de l'écran, profil GAMMA du rendu de l'image). Cette indépendance de l'opérateur et de la plateforme utilisée permet une plus grande répétabilité inter-opérateur des résultats d'analyse des cartographies IRM.

5.2 Présentation de l'algorithme de segmentation

La segmentation a lieu directement après le calcul des cartographies quantitatives. Le calcul de ces cartographies fait apparaître quelques artéfacts, surtout en T2. Il faut donc filtrer les artéfacts au plus tôt pour limiter au maximum leur propagation dans les résultats.

5.2.1 Filtrage des artéfacts

Après plusieurs essais, le meilleur filtrage des artéfacts s'est avéré être uniquement un plafonnement des valeurs absurdes.

Le T1 (respectivement T2) ne sera jamais au delà de 2000ms (respectivement 250ms) dans le disque (Mwale, Iatridis, & Antoniou, 2008). Cet aplatissement du signal prépare le filtre Gaussien suivant, permettant une meilleure application de ce dernier, et un point de repère pour l'exclusion des zones d'artéfacts pendant la segmentation automatique.

La première étape de la segmentation automatique des disques est donc le plafonnement du signal.

5.2.2 Détection des contours

La seconde étape est celle de la détection des contours. La segmentation est mathématiquement simple, il suffit de détecter les arêtes d'une certaine taille, et de les afficher. De nombreux algorithmes de détection d'arêtes existent, et l'un des meilleurs pour le type d'image ici utilisé, est la détection à l'aide de l'automate de Canny (Kimmel & Bruckstein, 2003).

Cet automate possède les caractéristiques suivantes (Canny, 1986):

- Une bonne détection : le taux d'erreur dans la signalisation est faible;
- Une bonne localisation : Les contours détectés sont proches des contours réels (minimisation des distances);
- Une bonne clarté : Une seule réponse par contour et un taux de faux positifs négligeable.

L'automate de Canny commence toujours par une réduction de bruit. Un filtre gaussien, de la forme :

$$(5.2.2.1) \quad G(x,y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}}$$

est appliqué à l'image. Le paramètre *sigma* de ce filtre est initialisé à $\sqrt{2}$ et la taille de la matrice de filtrage est laissée au choix automatique de Matlab. La taille de ce masque est cruciale pour la détection, Matlab étant très conservateur, il a tendance à utiliser un petit masque, ce qui augmente la sensibilité du détecteur au bruit mais réduit l'erreur de localisation : C'est le comportement recherché.

Une fois le masque Gaussien appliqué à l'image, l'automate applique un gradient permettant de retourner l'intensité des contours. Deux masques de convolution sont utilisés, un de direction X, l'autre de direction Y, permettant d'obtenir le gradient en un point.

$$(5.2.2.2) \quad G_x = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad G_y = \begin{bmatrix} 1 & -2 & 1 \end{bmatrix}, \quad |G| = |G_x| + |G_y|$$

L'étape suivante est celle du seuillage des contours, permettant ainsi de décider si oui ou non les pixels font parti d'un contour sur l'image source. Cette opération se fait sur les maxima locaux

(i.e. les points de gradients où la dérivée s'annule) par rapport aux paramètres passés à l'automate (ici, un vecteur de deux valeurs, les seuils minimum et maximum).

En chaque point, l'intensité du gradient est analysée :

- Si elle est inférieure au seuil minimal, le point est rejeté;
- Si elle est supérieure au seuil maximal le point est accepté comme faisant partie d'un contour. Ce contour peut être déjà existant ou ce point peut-être le départ d'un nouveau contour.
- Entre les seuils minimal et maximal, le point est accepté uniquement s'il est connecté à un point faisant déjà partie d'un contour. Sinon, il est rejeté.

Une fois cette passe terminée, il reste un fichier de type logique contenant les points rattachés à un contour et les autres.

Ce masque peut alors être traité pour former un masque applicable aux cartographies quantitatives.

5.2.3 Fonction utilisée

La fonction Matlab *Slice2* (code en annexe 1) a été créée pour permettre la segmentation rapide des disques. Cette fonction requiert la cartographie quantitative et un plafond maximal en entrée et ressort une image de type *PNG* contenant les arêtes détectées pour un disque (Figure 5-1).



Figure 5-1 : Sortie de *Slice2*

Ce fichier PNG doit alors être traité pour supprimer les faux-positifs restants et remplir les contours (Figure 5-2).



Figure 5-2 : Disque segmenté résultant (ici, un disque complet pour la diffusion)

CHAPITRE 6 CONCEPTION D'UN APPAREIL DE SOLLICITATION MÉCANIQUE DU DISQUE INTERVERTÉBRAL

Les articles précédents permettent de mettre en évidence qu'il n'y a que peu, voire pas, de modification des paramètres IRM lors de la compression instantanée du disque intervertébral, et qu'un changement visible apparaît lors de l'hydratation des tissus. Cette étude a été réalisée en compression statique à court terme, or, il est connu que la compression dynamique sur le long terme entraîne des changements dans la composition et les propriétés mécaniques du disque. Il est intéressant de pouvoir suivre ces changements par IRM, d'où la nécessité de concevoir un montage permettant la culture et la sollicitation du disque sur le long terme, et son imagerie par IRM.

6.1 Cahier des charges

Les deux fonctions principales du montage à concevoir sont :

- F1. Culture du disque;
- F2. Sollicitation mécanique du disque.

Ces deux fonctions principales sont accompagnées d'une fonction de contrainte de premier niveau:

- FC1. Permettre le passage du montage dans un système IRM.

6.1.1 Culture du disque

La fonction de culture doit assurer la survie du disque pendant un temps fixé à 15 jours, tout en n'empêchant pas la fonction de sollicitation, ni celle d'imagerie.

Les fonctions intervenant ici sont donc :

- F1.1 Assurer la survie du disque pendant 15 jours, décomposée en :

- F1.1.1 Permettre le changement de bain de culture;

- F1.1.2 Avoir une contenance de bain de culture au moins égale à cinq fois le volume du disque;

F1.1.3 Permettre une inspection visuelle du disque dans le média de culture;

F1.1.4 Permettre une inspection visuelle du média de culture

Fc1.2 Ne pas contaminer le média de culture;

F1.3 Pouvoir changer le média de culture simplement, sans démontage;

6.1.2 Sollicitation mécanique du disque

F2.1 Assurer une prise du disque robuste, décomposée en :

F2.1.1 Mise en position robuste;

F2.1.2 Maintien en position robuste;

F2.1.3 Mise en position répétable;

F2.1.4 Ne pas endommager le site de prise.

F2.2 Permettre la sollicitation mécanique dynamique dans 5 ou 6 axes;

Fc2.3 Ne pas induire de mouvements parasites dans la sollicitation mécanique;

F2.4 Maintenir une compression au repos;

F2.5 Appliquer la sollicitation mécanique par un appareillage externe à la chambre de culture.

F2.6 Sollicitation mécanique répétable;

F2.6.1 Déviation minimale sur la répétabilité;

F2.6.2 Prendre en compte le paramètre de hauteur du disque dans la chambre;

F2.6.3 Interface de sollicitation simple.

6.1.3 Permettre l'imagerie IRM

FC1.1 Ne pas contenir d'éléments métalliques;

FC1.2 Ne pas contenir de bulles d'air dans la zone de travail;

FC1.3 Ne pas créer d'interférence par la géométrie du montage;

FC1.4 Pouvoir être inséré dans une antenne de tête.

Table 6-1 : Table d'analyse de conception

Fonction	Pondération	Libellé	Critère	Niveau
F1	10	Culture du disque	15j, viabilité	
F1.1	10	Assurer la survie du disque pendant 15j	90%	+5j, $\pm 10\%$
F1.1.1	10	Permettre le changement de bain de culture	15j	+5j
F1.1.2	8	Avoir une contenance de bain de culture au moins 5x volume disque	5x vol di	± 1 vol
F1.1.3	2	Permettre une inspection visuelle du disque dans le média de culture		
F1.1.4	4	Permettre une inspection visuelle du média de culture		
Fc1.2	8	Ne pas contaminer le média		
F1.3	10	Changement de média de culture sans démontage		
F2	10	Sollicitation mécanique du disque		
F2.1	10	Assurer une prise du disque robuste	± 1 mm	$\pm 0,25$ mm
F2.1.1	6	Assurer une mise en position robuste	± 1 mm	$\pm 0,25$ mm
F2.1.2	8	Maintien en position robuste	$\pm 0,5$ mm	$\pm 0,25$ mm
F2.1.3	8	Mise en position répétable	± 1 mm	$\pm 0,25$ mm
F2.1.4	10	Ne pas endommager le disque		
F2.2	8	Permettre la sollicitation mécanique du disque	6 axes	- 1 axe
Fc2.3	8	Ne pas induire de mouvements parasites	$\pm 0,25$ mm	$\pm 5\%$
F2.4	7	Maintenir une compression au repos	10%	$\pm 5\%$
F2.5	4	Application externe de sollicitation mécanique		
F2.6	10	Sollicitation mécanique répétable	$\pm 0,25$ mm	$\pm 5\%$
F2.6.1	6	Déviations minimales sur la répétabilité	$\pm 0,25$ mm	$\pm 5\%$
F2.6.2	8	Prendre en compte le paramètre de hauteur du disque dans la chambre	$\pm 5\%$	
F2.6.3	5	Interface de sollicitation simple		
FC1	11	Permettre le passage du montage dans un IRM		
FC1.1	10	Ne pas contenir d'éléments métalliques		
FC1.2	8	Ne pas contenir de bulles d'air dans la zone de travail	0 bulles	0
FC1.3	2	Ne pas créer d'interférences par la géométrie du montage		
FC1.4	10	Pouvoir être installé dans une antenne de tête		

6.2 Solutions choisies

6.2.1 Culture du disque

6.2.1.1 Assurer la survie du disque, assurer sa culture

Le type de culture utilisé est déterminant pour la conception de la chambre. En effet la grande majorité des techniques de cultures présentes dans la littérature nécessitent la circulation d'un fluide dans la chambre de culture et le placement du disque entre deux filtres (Figure 6-1). Dans notre cas, ce type de culture est rédhibitoire, en effet, les filtres présentant une porosité suffisamment fine sont métalliques.

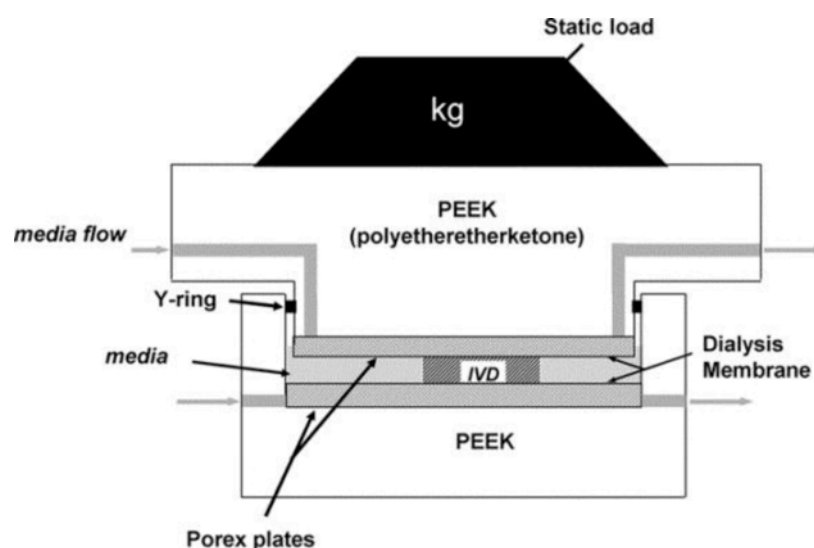


Figure 6-1 : Exemple de technique traditionnelle de culture de disque intervertébral (adapté de (Lee, Iatridis, Poveda, & Alini, 2006))

Devant être placé au plus près du disque, i.e. dans la chambre de culture, les filtres se retrouveraient dans l'IRM, de fait, incompatible avec la contrainte non métallique. Un autre problème de ce type de montage est la circulation du fluide. En effet, il faudra arrêter cette circulation pendant l'acquisition IRM, posant le problème de la fermeture du circuit, du drainage du surplus, puis de sa réouverture. Ces manipulations peuvent amener à une contamination du milieu de culture et éventuellement des problèmes de fuite à force de connecter et déconnecter les pompes.

Il existe cependant un autre protocole de culture (Haglund, 2011) permettant la culture du disque dans un volume de média (Gawri, et al., 2011) très supérieur à son propre volume, permettant ainsi de s'affranchir de la circulation (grâce au grand volume de fluide par rapport au volume du disque) et du placement du disque entre filtres (grâce à la non-circulation du fluide).

La préparation des disques est classique avec dissection des tissus gras et du muscle autour de la partie discale, ensuite le corps vertébral est scié proche du disque, puis le disque est poncé pour arriver à la plaque de croissance (Figure 6-2).

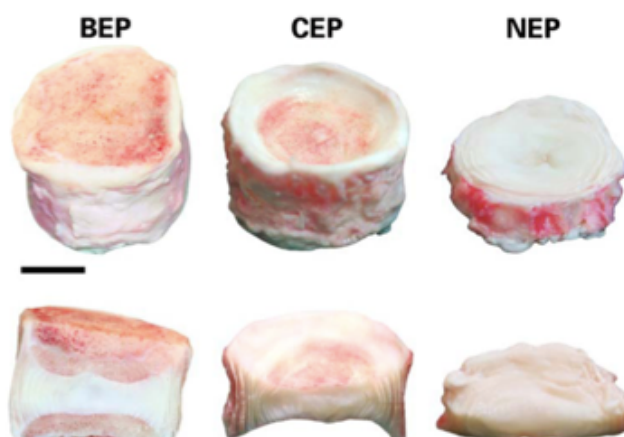


Figure 6-2 : Disques disséqués, BEP disque avec plaques cartilagineuses et os vertébral, CEP disque avec uniquement les plaques cartilagineuses, NEP disque entièrement disséqué (adapté de (Jim, et al., 2011))

Cette technique de préparation est doublement positive, d'une part elle permet de s'affranchir de la totalité des pompes, filtres et tuyauteries, d'autre part elle permet, grâce à la partie d'os cortical restante, une prise du disque très robuste. De plus, la présence de l'os cortical permet d'annuler le gonflement du disque lors de la mise en culture (Figure 6-3).

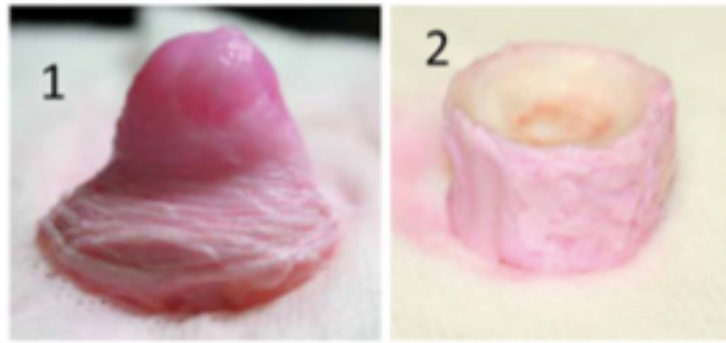


Figure 6-3 : Différence entre la culture du disque entièrement isolé et celui gardant les corps vertébraux ainsi que les plaques cartilagineuses (adapté de (Jim, et al., 2011))

La seule contrainte réelle de ce type de culture est la nécessité de changer le média de culture assez souvent (de l'ordre de deux à quatre jours).

6.2.1.2 Assurer la viabilité du média de culture

Cette fonction se réalise simplement au niveau du choix des matériaux en contact avec le média dans la chambre. Cette contrainte est simplement réalisable au moment de la conception par un choix judicieux des matériaux utilisés en faisant attention que ceux-ci ne se dissolvent pas dans le média de culture.

Le second point de viabilité, symbolisé par F1.3 est la possibilité de changement de média de culture, sans démontage du disque. Au moment de la conception, un orifice de drainage et un de remplissage seront prévus pour permettre le changement de média de culture.

6.2.2 Sollicitation

6.2.2.1 Assurer une prise robuste

La plus grande difficulté revient au montage du disque dans la chambre. Ce dernier doit être sécurisé et être positionnable de manière répétable.

La mise en position du disque se doit d'être la plus isostatique possible. Plus cette mise en position se rapproche de l'isostatisme pur (blocage non redondant des six degrés de liberté), plus elle sera répétable.

Le maintien en position n'est pas une composante de la mise en position, et ne doit pas être considéré comme tel. Un maintien en position parfaite est le minimum nécessaire pour bloquer

le(s) dernier(s) degrés de liberté sans entraîner de redondance entre la mise en position et le maintien en position.

Dans le cas présent, le schéma général d'une mise en position (MIP) possible est très simple :

- Un plan permettant le blocage de deux rotations et d'une translation;
- Deux tétons (placés sur des vis, à 120 degrés, pour un réglage de diamètre) pour le blocage des translations (un téton) et de la rotation restante (combinaison des deux tétons).

Le maintien en position (MAP) est ici réalisé grâce au diptyque des tétons placés à 120 degrés complété par une vis, de préférence à bout cuvette, venant compléter le triangle formé par les deux tétons. Ce maintien en position va venir mettre le disque en position selon un hyperstatisme d'ordre 1, le minimum atteignable avec cette technique de mise en position. Cette faible valeur d'hyperstatisme va permettre une répétabilité optimale dans le placement de l'échantillon dans la chambre de culture.

Cette combinaison MIP/MAP sera donc réalisée, cependant, elle demande un ajustement pour chaque disque, avec mise en place des tétons au mieux pour s'approcher du centrage parfait du disque, et le placement de la vis de maintien de la même manière.

Une autre solution, complémentaire, permettant de s'affranchir de ce problème, serait de mettre en place non plus une MIP en utilisant deux tétons, un appui plan et une MAP en utilisant simplement une cuvette, mais de passer à une MIP utilisant un appui plan et une MAP combinée à cette MIP utilisant trois tétons concentriques. Cette solution a l'avantage de laisser le centrage entièrement indépendant de l'opérateur; cependant elle fait intervenir un nombre conséquent de pièces mobiles et de ressorts.

La solution choisie est ici celle de différenciation MIP et MAP en utilisant le premier schéma décrit, illustré ci-après (Figure 6-4).

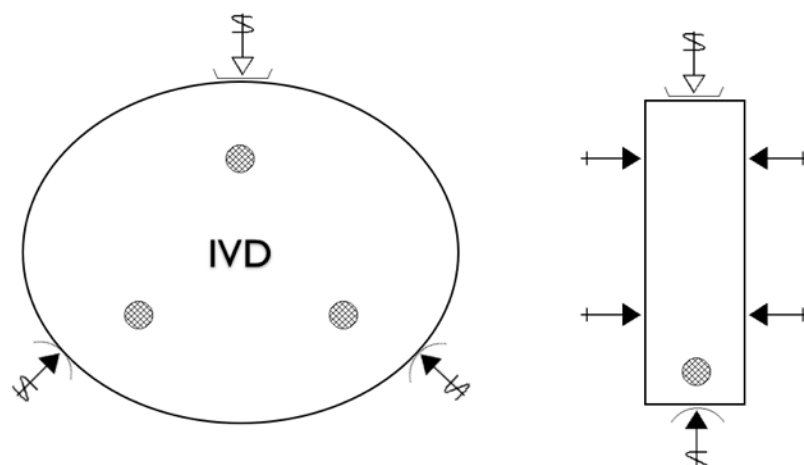


Figure 6-4 : Schéma de la mise en position et du maintien en position du disque dans la chambre de culture

6.2.2.2 Permettre une sollicitation multiaxiale, appliquée par une série d'effecteurs externes

Pour permettre l'application des fonctions de contrainte FC1.1 et FC1.3, la sollicitation mécanique est réalisée à l'aide d'un exosquelette se greffant sur la chambre. Cette solution technique permet tout d'abord d'utiliser des outils simples disponibles dans le commerce sans devoir les adapter aux hauts champs magnétiques (travail à 3 Tesla) et à la contrainte d'encombrement de l'antenne de tête (Figure 6-5).

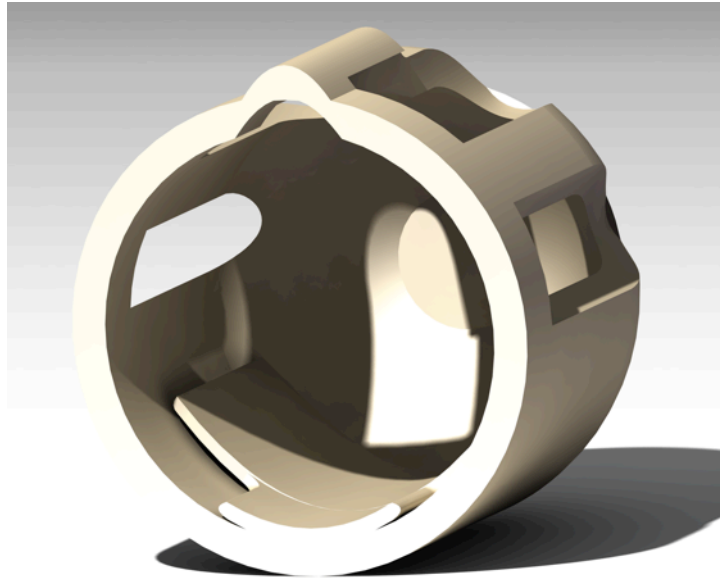


Figure 6-5 : Modèle de l'antenne de tête utilisé pour la conception

L'utilisation d'un exosquelette pose un point supplémentaire, l'attachement de ce dernier sur la chambre de culture. Une fois encore, cet attachement se doit d'être le plus proche du pur isostatique. Ce dernier sera étudié plus loin, une fois le mode de sollicitation choisi.

Le choix d'utiliser un exo-effecteur pour la sollicitation ouvre la possibilité à quatre grandes familles :

- Le robot delta;
- L'hexapode;
- Le robot linéaire (type H);
- Le bras robotique.

Les critères principaux de choix ont été pour moitié le prix de revient, et pour l'autre moitié, la précision de l'effecteur.

Le robot delta a été écarté de part son coût. En effet, il est difficile de réaliser à partir de zéro un robot delta précis, et l'assemblage de différentes pièces du commerce est rapidement très onéreux pour obtenir le taux de précision demandé. De plus, un robot delta pur est capable de travailler en trois axes seulement (seules les trois translations sont accessibles). Il est nécessaire d'utiliser un effecteur spécifique monté sur la platine du robot pour obtenir les deux axes de plus (ici, deux rotations) spécifiés dans le cahier des charges.

L'hexapode a été écarté pour sa limite de mouvement. ; En effet, un hexapode est capable de bouger selon les six axes, cependant, les mouvements sont très rapidement limités si on ne veut pas de couplage entre eux. Le prix des solutions commerciales et la difficulté de réalisation de ces robots à partir de zéro ont conduit à leur élimination.

Les deux robots restants sont donc le robot type H et le bras robotique. Ces deux robots sont sensiblement au même niveau quant au calcul du critère de choix. Le type H a l'avantage au niveau du prix tandis que le bras robotique a l'avantage au niveau de la précision. Le choix final entre ces deux robots a été la possibilité de monter un bras robotique de taille adéquat à partir de pièces disponibles dans le commerce, en utilisant des composants aux tolérances serrées, chez Lynxmotion³ (Figure 6-5).

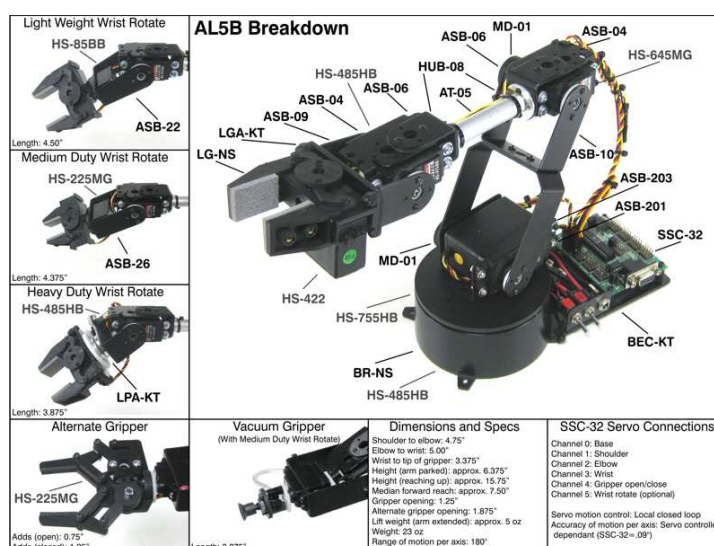


Figure 6-6 : Lynxmotion bras robotique (LynxMotion)

Une fois l'effecteur choisi, il reste à définir l'attachement entre ce dernier et la chambre de culture. Cet attachement doit permettre d'être sollicité, donc avoir une bonne attache, et aussi de mettre la chambre dans un gabarit pouvant appliquer une compression contrôlée. Ceci pourra être fait en utilisant deux centreurs situés à 150 degrés sur l'embase, le maintien en position étant assuré par vissage. Le niveau supérieur est lié en utilisant un centreur et deux vissages, permettant ainsi un changement entre la plaque de compression et le robot.

³ www.lynxmotion.com

6.3 Validation et paramétrages

La première étape consiste à cerner les limites de taille maximale des disques. La littérature (S. Roberts, Menage, Sivan, & Urban, 2008), ainsi que les dissections en compagnie de l'équipe de Lisbeth Haglund ont permis de choisir comme diamètre maximal du disque une valeur de 1,75 pouces (44,5mm). La chambre de culture est donc conçue avec un diamètre interne de 2,25 pouces, ce qui crée, une fois pris en compte la MIP et la MAP, une chambre utilisable de l'ordre de 1,85 pouces (Figure 6-7).

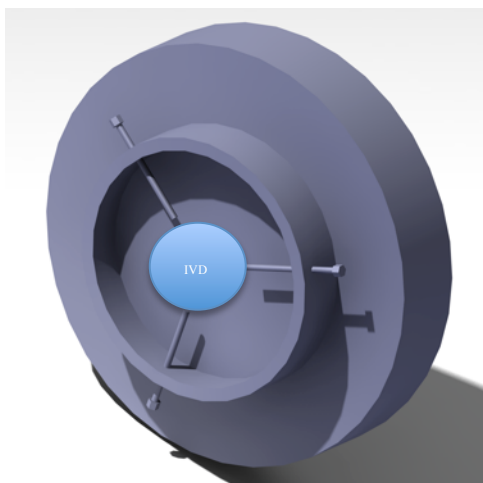


Figure 6-7 : Placement du disque dans la chambre de culture

La mise en place du disque se fera dans une poche de profondeur maximale 0,35 pouces (8,9mm). Cette hauteur doit permettre de pouvoir placer le disque entre les vis pour qu'il soit le plus plat possible. En effet, au moment du sciage du corps vertébral, il n'est pas évident de réaliser une découpe parfaitement parallèle au disque. Le jeu présent ici permet de corriger ce parallélisme, tant sur la face supérieure que la face inférieure du disque. Les deux flasques (supérieur et inférieur) sur lesquels le disque est ancré sont strictement identiques, ce qui permet une standardisation des pièces. Ces deux flasques sont liés par une gaine de silicone accrochée à l'aide d'un collier de serrage et d'un joint de silicone en haut et bas. Ce système permet l'utilisation d'un matériau transparent permettant de répondre à la demande de voir le média de culture, donc le disque, au travers de la chambre. Il est donc possible, en plus de l'imagerie par résonance magnétique, de faire une inspection visuelle du pourtour du disque pendant sa sollicitation (Figure 6-8).

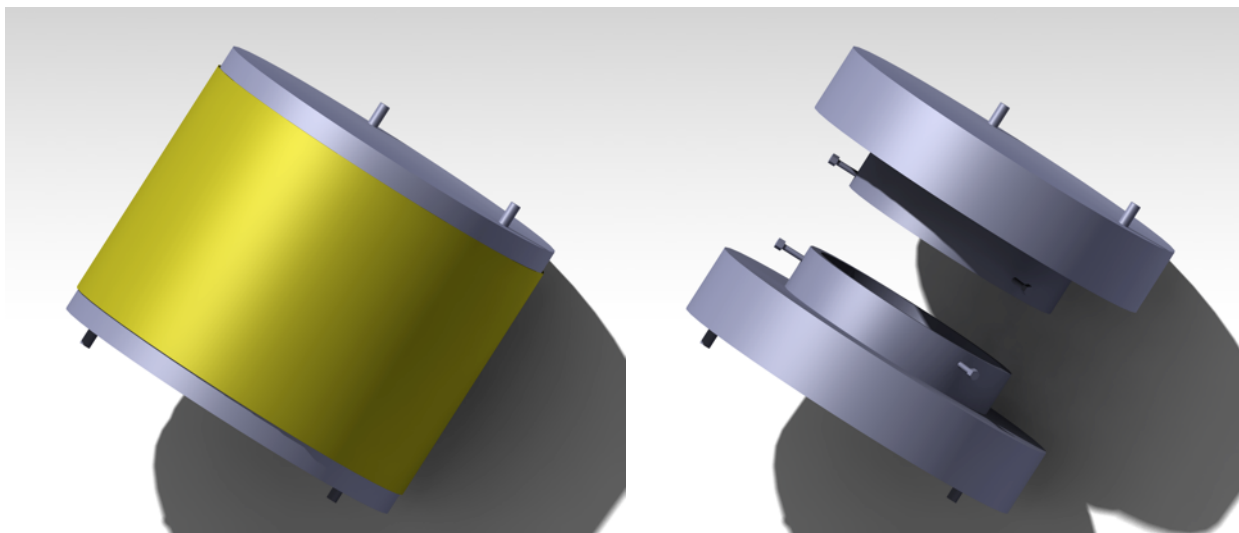


Figure 6-8 : Vue de la chambre de culture, avec et sans le mur externe

6.4 Modélisation

Une fois tous les paramètres décidés et validés, la modélisation est effectuée sur le logiciel CATIA. Au final, l'assemblage de la chambre n'est constitué que de très peu de pièces. La partie complexe est externalisée sur l'exosquelette robotisé.

6.4.1 Flasque

Les deux flasques supérieur et inférieur sont, comme mentionné précédemment, la même pièce (Figure 6-4, Figure 6-9). Seule change la partie inférieure, là où s'attachent, d'un côté le socle, de l'autre le robot ou la barre de garde de compression. Les flasques sont usinés dans la masse dans un plastique, une variété de polyoxyméthylène choisi pour ses capacités d'usinage, le fait que ce plastique n'ait que peu ou pas de pores ouverts en surface et pour sa capacité autolubrifiante.

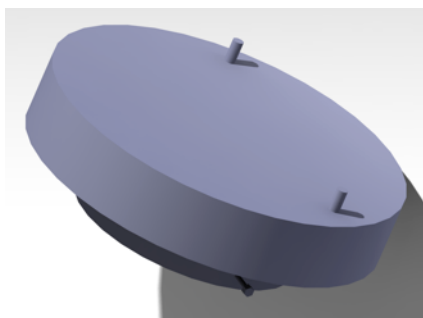


Figure 6-9 : Vue supérieure du flasque d'attache du disque

6.4.2 Mur

La fermeture de la chambre s'effectue à l'aide d'un liner silicone conditionné en cylindre de diamètre 4 pouces (101,6mm). La fixation sera réalisée à l'aide d'un joint de type silicone adhérent sur le flasque, et d'un collier de serrage de type tyrap en polyamide ou nylon.

6.4.3 Socle de sollicitation

Le socle permettant la sollicitation est simplement l'embase du bras robotique. Ce socle permet un placement précis de la chambre sur l'actionneur et sa sollicitation. Il possède deux mortaises dans lesquelles viennent s'insérer les centreurs de la partie inférieure de la chambre, le maintien en position se fait par deux vis.

6.4.4 Préhenseur robotique

Le préhenseur utilisé est directement celui venant en kit de Lynxmotion. La pince de bout est remplacée par une plaque de fixation à la chambre. Le préhenseur est fixé au socle de sollicitation, ainsi il est possible d'obtenir une référence fiable connaissant la hauteur du disque.

6.4.5 Socle de repos/imagerie

Ce dernier socle est utilisé lors des phases de repos, i.e. quand le disque n'est pas en train de faire un cycle de chargement. Il permet de maintenir le disque sous compression contrôlée, et l'imagerie en maintenant cette compression. Il se fixe sur les parties inférieure et supérieure de la chambre de la même manière que le socle de sollicitation et le bras robotique (Figure 6-10).

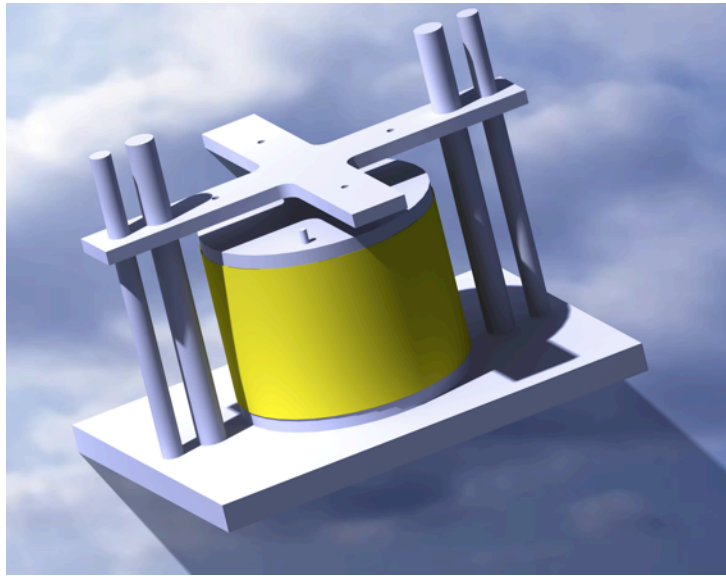


Figure 6-10 : Modèle CATIA de la chambre de culture dans le socle de sollicitation

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif de cette recherche était de concevoir une chambre de culture du disque intervertébral permettant sa sollicitation mécanique au-delà de la simple compression, le suivi de ce chargement complexe en utilisant l'imagerie par résonance magnétique. L'objectif a été atteint par la proposition de chambre de compression et du système de sollicitation corolaire. Pour atteindre cet objectif, il a été produit deux articles; le premier permettant de conclure l'indifférence des paramètres IRM quantitatifs à la compression instantanée, le second permettant de conclure à la non-utilité des paramètres quantitatifs T1 et T2 dans le cas de la dégénérescence enzymatique du disque et donnant une direction vers la diffusion pour suivre ce cas de dégénérescence.

L'étude sur la compression a montré l'inertie du disque, en cas d'application statique sur un disque *in-vitro*. Il est cependant connu dans la littérature qu'il y a un changement de hauteur et de contenu en eau du disque *in-vivo* pendant le cycle journalier (N. Roberts, Hogg, Whitehouse, & Dangerfield, 1998). Cependant, ce changement est, pour beaucoup, induit par la contenance en eau du disque et le fait qu'il maintient sa pression osmotique entre les corps vertébraux, ce qu'il ne peut faire *in-vitro*. La diffusion permet de voir une différence au niveau de la direction de compression et une augmentation dans le plan radial; ce changement de la diffusion est caractéristique de la compression.

Cette étude de compression a permis une avancée majeure dans deux directions principales; la première montrant que les résultats de compression *in-vitro* ne sont pas transposables au *in-vivo*, du fait de la disparition de la pression osmotique, le signal IRMq ne change pas, ce qui est totalement contredit par les résultats *in-vivo*. De plus, ce non changement dans le cas du disque isolé, jusqu'à une compression de 40%, permet de ne pas se soucier de la compression lors de l'étude du disque *in-vitro*, cette dernière ne venant pas fausser les résultats obtenus.

L'effet de la digestion s'est montré ténu sur les paramètres IRM. Le protocole expérimental choisi, de faire varier de manière couplée la concentration en trypsine et la durée de digestion (augmentation de la concentration avec la durée) ne permet pas de tirer de conclusions sur l'effet de la digestion par la trypsine à concentration donnée, mais permet de décrire, et de renforcer, la conclusion tirée lors de l'article que les produits de la dégradation des protéoglycanes par la

trypsine agissent comme agent de contraste au niveau des paramètres T1 et T2. Ces conclusions, ainsi que les forts changements observés sur l'imagerie de diffusion, tendent à conseiller et orienter les travaux futurs faisant intervenir la trypsine, et plus généralement le clivage enzymatique, vers l'imagerie de diffusion au détriment de la recherche des paramètres T1 et T2. La comparaison avec les tissus hydratés a permis d'observer une très grande différence entre le tissu uniquement hydraté et le tissu hydraté et traité à la trypsine, renforçant l'idée d'utiliser l'imagerie de diffusion.

La méthode de digestion utilisée, i.e. le trempage dans un volume de PBS additionné de trypsine, semble être unique dans la littérature. Les études utilisant la trypsine dans le disque intervertébral utilisent, pour leur quasi-intégralité, des segments comprenant 3 liaisons intervertébrales complètes et injectent la trypsine directement dans le nucléus de chaque disque (Antoniou et al., 2006; Mwale et al., 2008).

Bien que la méthode de digestion soit peu usitée dans la littérature, elle démontre de bons résultats pour induire un changement significatif sur de nombreux paramètres IRM. Cette méthode est simple, facilement répétable et permet donc d'obtenir de nombreux disques, dans un état semblable de dégénérescence, rapidement.

Le test colorimétrique utilisé pour caractériser le contenu en protéoglycanes dans le disque intervertébral est aussi un point de problème. Bien que beaucoup utilisé (Farndale, Buttle, & Barrett, 1986; Mwale, Demers, et al., 2008; Nimni, Cheung, Strates, Kodama, & Sheikh, 1987) et reconnu pour donner des résultats fiables, il conduit à des résultats sujets à de grandes déviations. La répétabilité du test DMMB est un des points faibles de la méthode, il n'a pu être réalisé que sur un échantillon restreint de disques soumis au cycle de digestion pour obtenir une tendance d'évolution des PG. Le test résulte en une absence de différence significative intergroupe, possiblement causée par la faible sensibilité de la méthode de test.

Au vu des résultats des tests colorimétriques, et des résultats des paramètres IRM, il serait intéressant d'aller plus loin et de rechercher les résidus provoqués par le clivage des protéoglycanes du disque. Si il est confirmé que ces résidus forment un agent de contraste pour le T1 et T2, l'hypothèse d'abandon de ces paramètres pour l'étude de dégénérescence serait confirmée.

Les études de compression et de digestion ont apporté de nombreux résultats qui ont pu être inclus dans le cycle de conception, et ont ainsi permis d'améliorer sensiblement les itérations de conception. Le test de compression, ainsi que la visite à l'équipe de Lisbeth Haglund (Gawri, et al., 2011), a permis la finalisation de toute la partie de chambre de compression, tandis que le test de digestion par la trypsine a permis de voir que, dans le cas du disque isolé, l'hydratation est un point plus important que la digestion enzymatique sur l'influence des paramètres IRM T1 et T2. Cependant la trypsine entraîne des changements significatifs dans l'imagerie de diffusion.

La conception mécanique proposée ici est encore à affiner, notamment face aux choix qui devront être faits lors de la fabrication des pièces. Elles sont prévues pour être usinées dans la masse à l'aide de CN (commande numérique), mais pourraient être réalisées en prototypage rapide, ce qui amènerait une dernière itération de modification de forme et d'ajout de renforts sur la majorité des pièces. Le dépôt de fil fondu est en effet plus fragile et extrêmement dépendant de l'orientation du fil lors de la dépose. De plus, le fil fondu est susceptible à des problèmes de délaminage lors de la sollicitation.

Il reste aussi à réaliser la commande du bras robotique, en effet, ce dernier, bien que complet, ne dispose pas de commande. Cette commande doit permettre la sollicitation de manière répétable du disque, et pourrait embarquer un ensemble d'accéléromètre et de jauges de contraintes pour avoir en temps réel une image de la sollicitation appliqué au bloc disque⁴.

Dans la conception telle qu'elle est faite présentement, la dissection du disque est le point crucial pour assurer une sollicitation dans de bonnes conditions. En effet, il faut qu'il reste suffisamment d'os cortical sur le disque pour permettre une bonne prise, et que ce dernier soit découpé le plus parallèlement possible au disque pour ne pas introduire de sollicitation couplée. Une suite possible à ce projet, est une étude d'une technique de prise permettant de s'affranchir, autant que possible, de la dissection du tissu.

Cette chambre vas permettre, à l'aide du suivi total par imagerie par résonance magnétique, de caractériser les chargement mécaniques dégénératifs du disque. Les cartographies obtenues pourront apporter une aide à la décision sur l'état réel d'un disque vu par imagerie. En effet, la

⁴ Le bloc disque représente ici le disque avec les plateaux cartilagineux et le reste d'os cortical.

plupart des disques apparaissent dégénérés à l'imagerie passé un certain âge, mais ne sont pas tous symptomatiques pour le patient. Il existe aussi l'inverse où un disque apparaît comme sain mais présente un désagrément pour le patient. L'imagerie contrastée permet le classement des disques (Thompson, et al., 1990) mais ne donne pas forcément leur état biologique. C'est là que viens s'intercaler l'imagerie quantitative, et l'obtention de la cartographie, permettant d'avoir une autre vision sur le disque.

Il est aussi connu que certains chargements sont régénératifs pour le disque (Huang & Gu, 2008), cette chambre peut donc aussi aider à la détermination de ce type de chargement pour ensuite permettre un passage clinique.

CONCLUSION

Ce projet permet d'initier la caractérisation 6-axes du disque intervertébral en culture *in-vitro* et son suivi par imagerie par résonance magnétique quantitative.

Les travaux accomplis ont permis une avancée significative dans le domaine de la caractérisation du disque intervertébral traité par enzymes. De plus, l'étude sur la compression était un prérequis fondamental à la finalisation de la conception de la chambre de culture. Le large nombre de tests IRM réalisé a aussi contribué à la conception de la chambre, autant pour les paramètres d'encombrement que de saisie pour le déplacement.

La poursuite de cette étude consistera à réaliser la fabrication de la chambre de culture, ainsi que la finalisation du système de sollicitation par la réalisation d'un programme pour le bras robotique. Un protocole de test devra être proposé pour le disque en sollicitation mécanique ainsi qu'un protocole d'acquisition IRM quantitative incluant la diffusion, le T1ρ et le CEST (Chemical Exchange Saturated Transfer), ou encore l'imagerie du sodium ou dGEMRIC...

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, M. A., & Hutton, W. C. (1982). Prolapsed intervertebral disc. A hyperflexion injury
1981 Volvo Award in Basic Science. *Spine (Phila Pa 1976)*, 7(3), 184-191.
- Adams, M. A., McNally, D. S., & Dolan, P. (1996). 'Stress' distributions inside intervertebral
discs. The effects of age and degeneration. *J Bone Joint Surg Br*, 78(6), 965-972.
- Alamin, T. F., Kim, M. J., & Agarwal, V. (2011). Provocative lumbar discography versus
functional anesthetic discography: a comparison of the results of two different diagnostic
techniques in 52 patients with chronic low back pain. *Spine J*, 11(8), 756-765.
- Antoniou, J., Mwale, F., Demers, C. N., Beaudoin, G., Goswami, T., Aebi, M., et al. (2006).
Quantitative magnetic resonance imaging of enzymatically induced degradation of the
nucleus pulposus of intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*, 31(14), 1547-1554.
- Antoniou, J., Pike, G. B., Steffen, T., Baramki, H., Poole, A. R., Aebi, M., et al. (1998).
Quantitative magnetic resonance imaging in the assessment of degenerative disc disease.
Magn Reson Med, 40(6), 900-907.
- Aubin, C. E., Dansereau, J., Petit, Y., Parent, F., de Guise, J. A., & Labelle, H. (1998). Three-
dimensional measurement of wedged scoliotic vertebrae and intervertebral disks. *Eur
Spine J*, 7(1), 59-65.
- Bashir, A., Gray, M. L., Hartke, J., & Burstein, D. (1999). Nondestructive imaging of human
cartilage glycosaminoglycan concentration by MRI. *Magn Reson Med*, 41(5), 857-865.

- Beattie, P. F., Brooks, W. M., Rothstein, J. M., Sibbitt, W. L., Jr., Robergs, R. A., MacLean, T., et al. (1994). Effect of lordosis on the position of the nucleus pulposus in supine subjects. A study using magnetic resonance imaging. *Spine (Phila Pa 1976)*, 19(18), 2096-2102.
- Boos, N., Wallin, A., Gbedegbegnon, T., Aebi, M., & Boesch, C. (1993). Quantitative MR imaging of lumbar intervertebral disks and vertebral bodies: influence of diurnal water content variations. *Radiology*, 188(2), 351-354.
- Brault, J. S., Driscoll, D. M., Laakso, L. L., Kappler, R. E., Allin, E. F., & Glonek, T. (1997). Quantification of lumbar intradiscal deformation during flexion and extension, by mathematical analysis of magnetic resonance imaging pixel intensity profiles. *Spine (Phila Pa 1976)*, 22(18), 2066-2072.
- Buckwalter, J. A. (1995). Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*, 20(11), 1307-1314.
- Campana, S., Charpail, E., de Guise, J. A., Rillardon, L., Skalli, W., & Mitton, D. (2011). Relationships between viscoelastic properties of lumbar intervertebral disc and degeneration grade assessed by MRI. *J Mech Behav Biomed Mater*, 4(4), 593-599.
- Canny, J. (1986). A Computational Approach to Edge Detection. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on, PAMI-8*(6), 679-698.
- Cassidy, J. J., Hiltner, A., & Baer, E. (1989). Hierarchical structure of the intervertebral disc. *Connect Tissue Res*, 23(1), 75-88.
- Chan, D., Song, Y., Sham, P., & Cheung, K. M. (2006). Genetics of disc degeneration. *Eur Spine J*, 15 Suppl 3, S317-325.

- Chan, S. C., Ferguson, S. J., & Gantenbein-Ritter, B. (2011). The effects of dynamic loading on the intervertebral disc. *Eur Spine J*.
- Chiu, E. J., Newitt, D. C., Segal, M. R., Hu, S. S., Lotz, J. C., & Majumdar, S. (2001). Magnetic resonance imaging measurement of relaxation and water diffusion in the human lumbar intervertebral disc under compression in vitro. *Spine (Phila Pa 1976)*, 26(19), E437-444.
- Chou, D., Samartzis, D., Bellabarba, C., Patel, A., Luk, K. D., Kisser, J. M., et al. (2011). Degenerative magnetic resonance imaging changes in patients with chronic low back pain: a systematic review. *Spine (Phila Pa 1976)*, 36(21 Suppl), S43-53.
- Costi, J. J., Stokes, I. A., Gardner-Morse, M., Laible, J. P., Scoffone, H. M., & Iatridis, J. C. (2007). Direct measurement of intervertebral disc maximum shear strain in six degrees of freedom: motions that place disc tissue at risk of injury. *J Biomech*, 40(11), 2457-2466.
- Dai, L. Y. (2000). Disc degeneration in patients with lumbar spondylolysis. *J Spinal Disord*, 13(6), 478-486.
- Farfan, H. F., Cossette, J. W., Robertson, G. H., Wells, R. V., & Kraus, H. (1970). The effects of torsion on the lumbar intervertebral joints: the role of torsion in the production of disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am*, 52(3), 468-497.
- Farndale, R. W., Buttle, D. J., & Barrett, A. J. (1986). Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta*, 883(2), 173-177.

- Fennell, A. J., Jones, A. P., & Hukins, D. W. (1996). Migration of the nucleus pulposus within the intervertebral disc during flexion and extension of the spine. *Spine (Phila Pa 1976)*, 21(23), 2753-2757.
- Gantenbein, B., Grunhagen, T., Lee, C. R., van Donkelaar, C. C., Alini, M., & Ito, K. (2006). An in vitro organ culturing system for intervertebral disc explants with vertebral endplates: a feasibility study with ovine caudal discs. *Spine (Phila Pa 1976)*, 31(23), 2665-2673.
- Gawri, R., Mwale, F., Ouellet, J., Roughley, P., Steffen, T., Antoniou, J., et al. (2011). Development of an organ culture system for long term survival of the intact human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*.
- Griffith, J. F., Wang, Y. X., Antonio, G. E., Choi, K. C., Yu, A., Ahuja, A. T., et al. (2007). Modified Pfirrmann grading system for lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*, 32(24), E708-712.
- Haglund, L., Moir, J., Beckmann, L., Mulligan, K., Jim, B., Ouellet, J., Roughley, P., Steffen, T. (2011). *Bioreactor development for axial loaded bovine discs*. Paper presented at the 17th Annual Canadian Connective Tissue Conference, École Polytechnique, Montréal.
- Hargreaves, B. A., Gold, G. E., Beaulieu, C. F., Vasanawala, S. S., Nishimura, D. G., & Pauly, J. M. (2003). Comparison of new sequences for high-resolution cartilage imaging. *Magn Reson Med*, 49(4), 700-709.
- Haschtmann, D., Stoyanov, J. V., Ettinger, L., Nolte, L. P., & Ferguson, S. J. (2006). Establishment of a novel intervertebral disc/endplate culture model: analysis of an ex vivo in vitro whole-organ rabbit culture system. *Spine (Phila Pa 1976)*, 31(25), 2918-2925.

- Horton, W. C., & Daftari, T. K. (1992). Which disc as visualized by magnetic resonance imaging is actually a source of pain? A correlation between magnetic resonance imaging and discography. *Spine (Phila Pa 1976)*, 17(6 Suppl), S164-171.
- Hsieh, A. H., & Twomey, J. D. (2010). Cellular mechanobiology of the intervertebral disc: new directions and approaches. *J Biomech*, 43(1), 137-145.
- Huang, C. Y., & Gu, W. Y. (2008). Effects of mechanical compression on metabolism and distribution of oxygen and lactate in intervertebral disc. *J Biomech*, 41(6), 1184-1196.
- Igbinedion, B. O., & Akhigbe, A. (2011). Correlations of Radiographic Findings in Patients with Low Back Pain. *Niger Med J*, 52(1), 28-34.
- Jackson, A. R., Yuan, T. Y., Huang, C. Y., Travascio, F., & Yong Gu, W. (2008). Effect of compression and anisotropy on the diffusion of glucose in annulus fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976)*, 33(1), 1-7.
- Jim, B., Steffen, T., Moir, J., Roughley, P., & Haglund, L. (2011). Development of an intact intervertebral disc organ culture system in which degeneration can be induced as a prelude to studying repair potential. *Eur Spine J*.
- Jongeneelen, C. J. M. (2006). *Biomechanics in the intervertebral disc* (MSc, Eindhoven University of Technology, Eindhoven). <http://www.mate.tue.nl/mate/pdfs/6700.pdf> (UMI No. MSc)
- Kimmel, R., & Bruckstein, A. M. (2003). Regularized Laplacian zero crossings as optimal edge integrators. *International Journal of Computer Vision*, 53(3), 225-243.

- Kiviranta, P., Toyras, J., Nieminen, M. T., Laasanen, M. S., Saarakkala, S., Nieminen, H. J., et al. (2007). Comparison of novel clinically applicable methodology for sensitive diagnostics of cartilage degeneration. *Eur Cell Mater*, 13, 46-55; discussion 55.
- Kornberg, M. (1989). Discography and magnetic resonance imaging in the diagnosis of lumbar disc disruption. *Spine (Phila Pa 1976)*, 14(12), 1368-1372.
- Kurunlahti, M., Kerttula, L., Jauhiainen, J., Karppinen, J., & Tervonen, O. (2001). Correlation of diffusion in lumbar intervertebral disks with occlusion of lumbar arteries: a study in adult volunteers. *Radiology*, 221(3), 779-786.
- LeBlanc, A. D., Evans, H. J., Schneider, V. S., Wendt, R. E., 3rd, & Hedrick, T. D. (1994). Changes in intervertebral disc cross-sectional area with bed rest and space flight. *Spine (Phila Pa 1976)*, 19(7), 812-817.
- Lee, C. R., Iatridis, J. C., Poveda, L., & Alini, M. (2006). In vitro organ culture of the bovine intervertebral disc: effects of vertebral endplate and potential for mechanobiology studies. *Spine (Phila Pa 1976)*, 31(5), 515-522.
- Linson, M. A., & Crowe, C. H. (1990). Comparison of magnetic resonance imaging and lumbar discography in the diagnosis of disc degeneration. *Clin Orthop Relat Res*(250), 160-163.
- Malko, J. A., Hutton, W. C., & Fajman, W. A. (1999). An in vivo magnetic resonance imaging study of changes in the volume (and fluid content) of the lumbar intervertebral discs during a simulated diurnal load cycle. *Spine (Phila Pa 1976)*, 24(10), 1015-1022.

- Marinelli, N. L., Haughton, V. M., Munoz, A., & Anderson, P. A. (2009). T2 relaxation times of intervertebral disc tissue correlated with water content and proteoglycan content. *Spine (Phila Pa 1976)*, 34(5), 520-524.
- Mwale, F., Demers, C. N., Michalek, A. J., Beaudoin, G., Goswami, T., Beckman, L., et al. (2008). Evaluation of quantitative magnetic resonance imaging, biochemical and mechanical properties of trypsin-treated intervertebral discs under physiological compression loading. *J Magn Reson Imaging*, 27(3), 563-573.
- Mwale, F., Iatridis, J. C., & Antoniou, J. (2008). Quantitative MRI as a diagnostic tool of intervertebral disc matrix composition and integrity. *Eur Spine J*, 17 Suppl 4, 432-440.
- Nerlich, A. G., Schleicher, E. D., & Boos, N. (1997). 1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*, 22(24), 2781-2795.
- Nerurkar, N. L., Elliott, D. M., & Mauck, R. L. (2010). Mechanical design criteria for intervertebral disc tissue engineering. *J Biomech*, 43(6), 1017-1030.
- Nimni, M. E., Cheung, D., Strates, B., Kodama, M., & Sheikh, K. (1987). Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement. *J Biomed Mater Res*, 21(6), 741-771.
- Nissi, M. J., Rieppo, J., Toyras, J., Laasanen, M. S., Kiviranta, I., Nieminen, M. T., et al. (2007). Estimation of mechanical properties of articular cartilage with MRI - dGEMRIC, T2 and T1 imaging in different species with variable stages of maturation. *Osteoarthritis Cartilage*, 15(10), 1141-1148.

- Pfirrmann, C. W., Metzdorf, A., Zanetti, M., Hodler, J., & Boos, N. (2001). Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*, 26(17), 1873-1878.
- Pope, M. H., Stokes, I. A., & Moreland, M. (1984). The biomechanics of scoliosis. *Crit Rev Biomed Eng*, 11(3), 157-188.
- Roaf, R. (1960). Vertebral growth and its mechanical control. *J Bone Joint Surg Br*, 42-B, 40-59.
- Roberts, N., Hogg, D., Whitehouse, G. H., & Dangerfield, P. (1998). Quantitative analysis of diurnal variation in volume and water content of lumbar intervertebral discs. *Clin Anat*, 11(1), 1-8.
- Roberts, S., Menage, J., Sivan, S., & Urban, J. P. (2008). Bovine explant model of degeneration of the intervertebral disc. *BMC Musculoskelet Disord*, 9, 24.
- Shirazi-Adl, A., Taheri, M., & Urban, J. P. (2010). Analysis of cell viability in intervertebral disc: Effect of endplate permeability on cell population. *J Biomech*, 43(7), 1330-1336.
- Stokes, I. A., Spence, H., Aronsson, D. D., & Kilmer, N. (1996). Mechanical modulation of vertebral body growth. Implications for scoliosis progression. *Spine (Phila Pa 1976)*, 21(10), 1162-1167.
- Thompson, J. P., Pearce, R. H., Schechter, M. T., Adams, M. E., Tsang, I. K., & Bishop, P. B. (1990). Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*, 15(5), 411-415.

- Urban, J. P., & McMullin, J. F. (1988). Swelling pressure of the lumbar intervertebral discs: influence of age, spinal level, composition, and degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*, *13*(2), 179-187.
- Urban, J. P., & Roberts, S. (2003). Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*, *5*(3), 120-130.
- Wang, C., Witschey, W., Elliott, M. A., Borthakur, A., & Reddy, R. (2010). Measurement of intervertebral disc pressure with T 1rho MRI. *Magn Reson Med*, *64*(6), 1721-1727.
- Yu, C. Y., Tsai, K. H., Hu, W. P., Lin, R. M., Song, H. W., & Chang, G. L. (2003). Geometric and morphological changes of the intervertebral disc under fatigue testing. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, *18*(6), S3-9.

ANNEXE 1 – Listing du programme *Slice2*

```

function Slice2=Slice2(Matrix, max_s)
Map = Matrix;
Map(Map>max_s)=max_s;
size0 = size(Map);

Output=zeros(size0(1),size0(2));

edgeim = edge(Map, 'canny', [0.075,0.125]);
h2=figure;
imagesc(edgeim)
axis equal
title('Select slice');
xlabel('Pixel');
ylabel('Pixel');
ROI_cord = getrect(h2);
y_min=round(ROI_cord(2));
y_max=round(ROI_cord(2)+ROI_cord(4));
x_min=round(ROI_cord(1));
x_max=round(ROI_cord(1)+ROI_cord(3));

h=waitbar(0,'morphing');
for m = y_min:y_max
    waitbar((m - y_min + m - y_max),h);
    for n = x_min:x_max
        Output(m,n)=edgeim(m,n);
    end
end
close(h);
close(h2);
prompt = {'type', 'stage', 'disque'};
dlg_title = 'Dice';
num_lines = 1;
answer = inputdlg(prompt, dlg_title, num_lines);

type=answer{1};

```

```
stage=answer{2};  
disque=answer{###3};  
imwrite(Output,['dk',type,'_',stage,'_',disque,'.png']);  
save(['dk',type,'_',stage,'_',disque], 'Output');
```